
**Generierung eines T-Zell-Rezeptor transgenen Mausmodells zur
Untersuchung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
Dissertation

von Michael Templin
aus Nordenham

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland
2. Referent: PD Dr. Michael Mähler
eingereicht am: 5. Juni 2003
mündliche Prüfung (Disputation) am: 24. September 2003
2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1	Morbus Crohn	2
1.1.2	Colitis ulcerosa	2
1.1.3	Epidemiologie	3
1.1.4	Ätiologie der CEDE	4
1.1.4.1	CEDE als inhärente Erkrankung durch genetische Prädisposition	5
1.1.4.2	CEDE als infektiöse Erkrankung durch pathogene Erreger	6
1.1.4.3	CEDE als Toleranzverlust gegenüber der intestinalen Darmflora	8
1.2	Der Gastrointestinaltrakt	9
1.2.1	Aufbau und Funktion	9
1.2.2	Intestinale bakterielle „Mikroflora“	12
1.3	Das gastrointestinale Immunsystem	13
1.3.1	Barrieren und unspezifische Abwehrmechanismen	13
1.3.2	Das Darm-assoziierte spezifische Immunsystem	14
1.3.2.1	Das induktive GALT	15
1.3.2.1.1	Aufnahme luminaler Antigene im Peyerschen Plaque	15
1.3.2.1.2	Präsentation luminaler Antigene	16
1.3.2.2	Initiation einer spezifischen Immunantwort	18
1.3.2.2.1	Inflammatorische T _H 1-Immunantwort	21
1.3.2.2.2	Humorale T _H 2-Immunantwort	21
1.3.2.2.3	Regulatorische T _H 3-Immunantwort	22
1.3.2.3	Effektor-Zellen des GALT	23
1.3.2.3.1	Lamina propria-Lymphozyten	25
1.3.2.3.2	Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)	25
1.3.2.3.3	Myeloide Effektorzellen der Lamina propria	26
1.3.2.4	Orale Toleranz	27
1.4	Mausmodelle für CEDE	28
1.4.1	T _H 1-Modelle	30
1.4.1.1	TNBS-induziertes Kolitis-Modell	31

1.4.1.2	SCID-Transfer-Modell	32
1.4.1.3	IL-10 ^{-/-} -defizientes Kolitis-Modell	34
1.4.2	T _H 2-Modelle	35
1.4.2.1	TCR- α ^{-/-} -defizientes Kolitis-Modell	35
1.4.3	Mausmodelle mit Barriere-Defekten	36
1.4.3.1	DSS-induziertes Kolitis-Modell	36
1.4.3.2	Δ NCAD-transgenes Chimären-Modell	36
1.4.4	TCR transgene Mausmodelle	37
1.4.4.1	OT-1 Transfer-Modell in IFABP-Ovalbumin transgene Mäuse	39
1.4.4.2	GFAP-HA x CL4-TCR doppelt transgenes Mausmodell	39
1.5	Aufbau des HA-spezifischen Kolitis-Modells	39
1.5.1	Hemagglutinin als Modellantigen	40
1.5.2	Darmspezifische Promotoren	41
1.5.3	HA-spezifische TCR-transgene Mauslinien	42
1.5.4	HA x TCR-HA und HA x CL4-TCR Mausmodelle	44
1.6	Zielsetzung der Arbeit	45
2	Material und Methoden	47
2.1	Molekularbiologische Methoden	47
2.1.1	Standardpuffer und –medien	47
2.1.2	Klonierung der transgenen Konstrukte	47
2.1.2.1	Bakterienstämme	47
2.1.2.2	Klonierungsvektoren	48
2.1.2.3	Enzyme	48
2.1.2.4	Enzymatische Modifikation von Plasmiden	48
2.1.2.5	Elektroporation von Bakterienzellen	49
2.1.2.5.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	49
2.1.2.5.2	Transformation von elektrokompenten Zellen	49
2.1.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA	50
2.1.2.6.1	Alkalische Lysis Minipräparation	50
2.1.2.6.2	Plasmidisolierung mit Hilfe von Chromatographie-Säulen	50
2.1.2.7	Analytische Gelelektrophoresen	51
2.1.2.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	51

2.1.2.9	Phenolisierung von Nukleinsäurelösungen	52
2.1.2.10	Fällung von Nukleinsäuren	52
2.1.2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.1.2.12	Polymerasekettenreaktion	52
2.1.3	Detektion transgener Mäuse	53
2.1.3.1	Isolierung genomischer DNA	53
2.1.3.2	PCR zur Identifizierung transgener Mäuse	53
2.1.3.3	Southern Blots	54
2.1.3.3.1	Restriktionsverdau der genomischen DNA	55
2.1.3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	55
2.1.3.3.3	Blotten der Gele	55
2.1.3.3.4	Sondengenerierung	56
2.1.3.3.5	Hybridisierung	57
2.1.4	Expressionsanalysen auf RNA-Ebene	57
2.1.4.1	Isolierung von RNA	58
2.1.4.2	DNase I-Behandlung von RNA-Proben	58
2.1.4.3	Reverse Transkription	59
2.1.4.4	PCR zur semiquantitativen Expressionsanalyse	60
2.1.4.5	Quantitative Realtime PCR	60
2.1.5	Expressionanalysen auf Proteinebene	63
2.1.5.1	Herstellung von Proteinlysaten	64
2.1.5.2	SDS Page Polyacrylamid Gelelektrophorese	64
2.1.5.3	Western Blot	65
2.1.5.4	Antikörpernachweis des Hemagglutinins	65
2.2	Zellbiologische Methoden	65
2.2.1	Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	66
2.2.1.1	Blut	66
2.2.1.2	Thymus und MLN	67
2.2.1.3	Milz	67
2.2.1.4	Intestinum	67
2.2.1.4.1	Intestinales Epithel	67
2.2.1.4.2	Lamina Propria	68
2.2.2	Automacs Depletion	68
2.2.3	Antikörperfärbungen	69

2.2.4	Durchflusszytometrie	70
2.2.5	Sortieren von Lymphozyten mit der Durchflusszytometrie	71
2.2.6	CFSE-Markierung von Lymphozyten	71
2.2.7	Antigenspezifische Stimulationsassays	71
2.3	Mausmodelle	72
2.3.1	Maushaltung	72
2.3.2	Generierung transgener Mäuse	73
2.3.3	Expressionsanalysen von HA-transgenen Mäusen	73
2.3.4	Transfermodell von TCR-HA Zellen in Villin-HA Mäusen	73
2.3.5	Autoimmune Villin-HA x TCR Modelle	74
2.4	Histologie	74
2.4.1	Probennahme und Schnittanfertigung	74
2.4.2	Auswertung der histologischen Präparate	74
2.4.3	Immunhistochemie	75
3	Ergebnisse	76
3.1	Generierung der HA-transgenen Mauslinien	76
3.1.1	Herstellung von IFABP-HA transgenen Mäusen	76
3.1.2	Herstellung von FABPi-HA transgenen Mäusen	79
3.1.3	Herstellung von Villin-HA transgenen Mäusen	81
3.1.4	Detektion TCR- und HA-transgener Mäuse	84
3.1.5	RNA Expressionsanalysen in HA-transgenen Mauslinien	85
3.1.5.1	HA mRNA Expression in HA-transgenen Mauslinien	85
3.1.5.2	Expression des HA-Proteins in Villin-HA transgenen Mäusen	88
3.2	Transfer-Modell von 6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in Villin-HA Mäuse	90
3.2.1	Adoptiv transferierte 6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in MLN und Milz von Empfänger-mäusen	90
3.2.2	Spezifische Aktivierung adoptiv transferierter 6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in Empfänger-mäusen	92
3.2.3	Infiltration des intestinalen Epithels in Villin-HA Mäusen	94
3.2.4	In-vivo Proliferation transferierter 6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	95
3.3	Autoimmunes Villin-HA x TCR-HA Modell	98
3.3.1	Zentrale Toleranz im Thymus von Villin-HA x TCR-HA Mäusen	99

3.3.2	6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen Villin-HA x TCR-HA transgener Mäuse	101
3.3.3	Aktivierung von 6.5 ⁺ CD4 ⁺ Lymphozyten in Villin-HA x TCR-HA Mäusen	102
3.3.4	In-vitro Proliferation von 6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	104
3.3.5	Infiltration des Dünndarms von Villin-HA x TCR-HA Mäusen durch CD3 ⁺ Lymphozyten	106
3.3.6	Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in 6.5 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ und 6.5 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	108
3.4	Autoimmunes Villin-HA x CL4-TCR Modell	110
3.4.1	Letale ulzerative Enterocolitis in Villin-HA x CL4-TCR transgenen Mäusen	111
3.4.2	Zentrale Toleranz im Thymus von Villin-HA x CL4-TCR Mäusen	112
3.4.3	Vβ8 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen Villin-HA x CL4-TCR transgener Mäuse	114
3.4.4	Aktivierung von Vβ8 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen	115
3.4.5	Nachweis Vβ8 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen mit HA-spezifischen MHC Klasse-I-Tetrameren	116
3.4.6	In-vitro Proliferation von Vβ8 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	117
3.4.7	Infiltration des Dünndarms von Villin-HA x CL4-TCR Mäusen durch CD3 ⁺ Lymphozyten	121
4	Diskussion	123
4.1	HA-transgene Mausmodelle	123
4.1.1	IFABP-HA transgene Mauslinien	126
4.1.2	FABPi-HA transgene Mauslinien	126
4.1.3	Villin-HA transgene Mauslinien	127
4.2	Das Transfer-Modell von 6.5 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in Villin-HA Mäuse	128
4.3	Die autoimmunen Villin-HA x CL4-TCR und Villin-HA x TCR-HA Modelle	130
4.3.1	Zentrale Toleranz	131

4.3.2	Villin-HA x TCR-HA Modell	132
4.3.3	Villin-HA x CL4-TCR Modell	135
4.4	Perspektiven für Villin-HA transgene Mäuse als Modellsystem für CEDE	137
5	Zusammenfassung	140
6	Literaturverzeichnis	142
7	Abkürzungsverzeichnis	170
8	Abbildungsverzeichnis	174
8.1	Abbildungen	174
8.2	Tabellen	175

1 Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CEDE) stellen schwere Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes dar. Diese Einleitung soll eine Übersicht zum derzeitigen Kenntnisstand von CEDE in der Klinik und Wissenschaft geben, dabei sollen die verschiedenen Hypothesen zur Ätiopathogenese dieser Erkrankungen erörtert werden. Im Anschluss werden die anatomischen Strukturen des Darms und des darmassoziierten Immunsystems dargestellt. Abschließend werden die zur Erforschung von CEDE relevanten Mausmodelle sowie die zum Verständnis der im Rahmen dieser Arbeit generierten Mausmodelle benötigten theoretischen Grundlagen erläutert.

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Tab. 1-1: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich

Die Tabelle stellt vergleichend pathologische Eigenschaften, klinische Symptome und Komplikationen von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn dar. Verändert übernommen aus „Morbus Crohn, Colitis ulcerosa“ von (Adler, 1998).

	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn
Pathologische Eigenschaften		
Segmentierung	0	++
Transmurale Entzündung	+/-	++
Granulome	0	+ / ++ (50%)
Fibrosen	+	++
Fistelbildung	+/-	++
Klinische Symptome		
Diarrhoe	++	++
Rektalblutungen	++	+
Abdominalschmerzen	+	++
Entzündung des Dünndarm	+/-	++
Entzündung des Rektums	++ (95%)	+ / ++ (50%)
Entzündung mesenterischer Lymphknoten	0	++
Komplikationen		
Extraintestinale Manifestationen	++	++
Stenosen	+	++
Toxischer Megakolon	+	+/-
Maligne Karzinome (nach langer Erkrankung)	+	+/-
Rückfallquote nach Kolektomie	0	+
0: niemals; +/- selten; +: vereinzelt; ++: häufig, meistens		

Der Begriff CEDE umfasst chronische inflammatorische und rezidivierende Störungen des Gastrointestinaltraktes mit bisher weitgehend ungeklärter Ätiopathogenese, die zu einer zunehmenden Zerstörung und Vernarbung der betroffenen Gewebeareale im Darm im Verlauf der Erkrankung führen (Strober *et al.*, 1998a). Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) stellen die beiden klinischen Manifestationen dieser Störungen im

Menschen dar (Podolsky, 1991), die anhand klinischer, makromorphologischer und histologischer Kriterien unterschieden werden (vgl. Tab. 1-1).

Die langandauernde Persistenz und die schwerwiegenden Symptome dieser Erkrankung führen zu einer erheblichen Verminderung der Lebensqualität, aber auch zu einem mehr als zweifach erhöhten Mortalitätsrisiko der betroffenen Patienten (Blumberg *et al.*, 2001). Das zentrale Symptom beider Erkrankungen ist Diarrhö, die im Falle von CU immer blutig ist. Weitere Symptome stellen Fieber, Abdominalschmerz und Gewichtsverlust dar (Fiocchi, 1998). Die Störung der Darmfunktionen führt bei Patienten zu Mangelzuständen (Vitaminmangel, Dehydrierung).

1.1.1 Morbus Crohn

Bei MC erstreckt sich die chronische Entzündung des Gastrointestinaltraktes transmural über sämtliche Darmwandschichten. Die Erkrankung manifestiert sich vornehmlich im terminalen Ileum und im Kolon (Kornbluth *et al.*, 1993). Im Extremfall breitet sie sich von dort aus diskontinuierlich über den gesamten Gastrointestinaltrakt aus. Histologisch lassen sich bei MC massive Infiltrate mononuklearer Zellen (Granulome) in allen Gewebeschichten nachweisen (Abb. 1-1A). Bei 10 bis 20% der Patienten mit MC manifestieren sich darüber hinaus extraintestinale Symptome, beispielweise Arthritis, Stomatitis oder Konjunktivitis. Durch Fistelbildungen können Entzündungen auf benachbarte Organe übergreifen. Aufgrund des transmuralen Entzündungsprozesses kommt es zu zusätzlichen Komplikationen, beispielsweise zu Stenosen bzw. Darmverengungen (Abb. 1-1D, Pfeil 1) oder auch zu einer Darmperforation mit tödlichem Verlauf.

1.1.2 Colitis ulcerosa

Bei der CU beschränkt sich der Entzündungsprozess in der Regel auf die Mukosa und Submukosa des distalen Kolons. Die Entzündung wird von Geschwürbildungen (Ulzerationen) und Eiterbildungen in den Krypten (Kryptenabzessen) begleitet (Abb. 1-1B). Aufgrund einer extremen Empfindlichkeit der entzündeten Kolonmukosa tritt bei der CU als Begleitsymptom die meist blutig-schleimige Diarrhö auf. Eine Komplikation stellt das „toxische Megakolon“ dar (Abb. 1-1D, Pfeil 2), bei der der Darm durch bakterielle Gasbildung aufgebläht wird. Das „toxische Megakolon“ kann zu einer Darmperforation führen. Bei langer Krankheitsdauer und Totalbefall des Dickdarms

(Abb. 1-1C) kommt es zu dysplastischen Veränderungen der Schleimhaut und zur Entstehung von Karzinomen (Jewell, 1993). Im Gegensatz zu MC ist CU durch die chirurgische Entfernung des Dickdarmes (Kolektomie) heilbar.

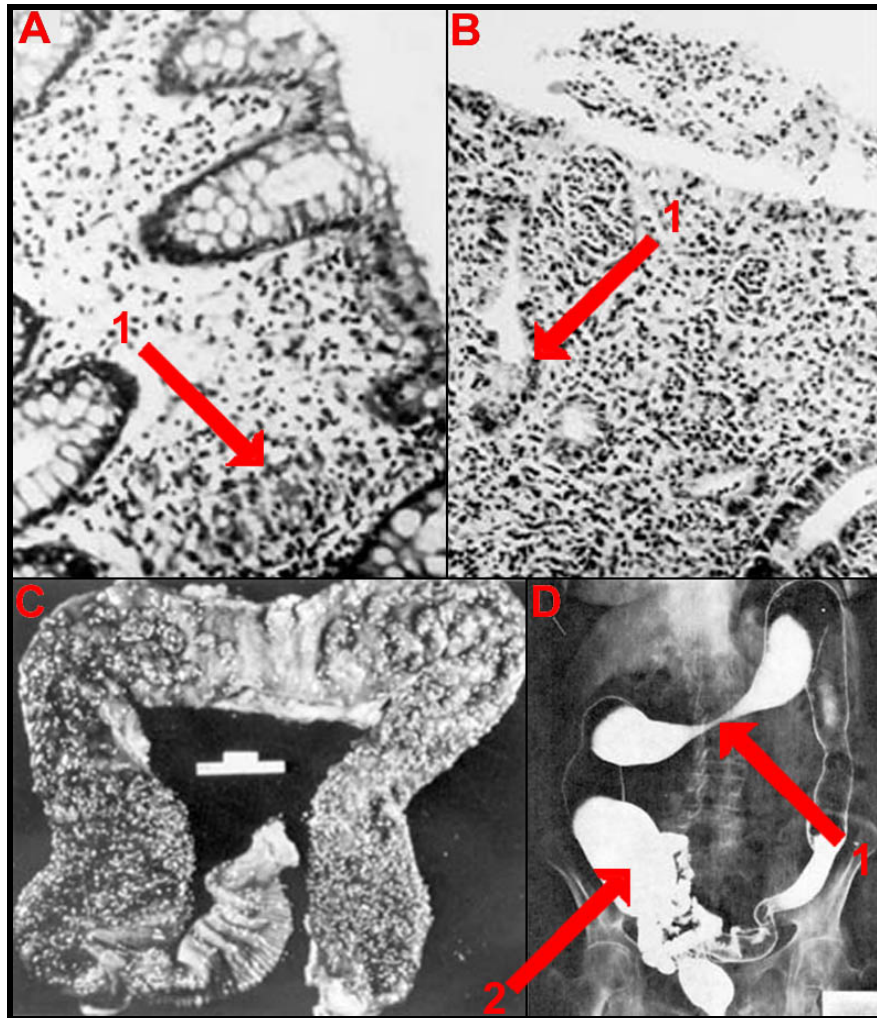


Abb. 1-1: Bildtafel zum Erscheinungsbild von CEDE

A und B zeigen histologische Schnitte des Darmepithels, A stellt eine Granulomentwicklung bei MC und B eine Abzessbildung bei CU dar. C zeigt eine Dickdarmbiopsie eines CU-Patienten, D eine Röntgenkontrastphotographie bei CU. Übernommen aus „Harrisons Internal Medicine Online“ (<http://www.harrisonsline.com>).

1.1.3 Epidemiologie

CEDE treten in allen Altersgruppen auf, der Erkrankungsgipfel liegt in der zweiten bis dritten Lebensdekade. Die Inzidenz für MC in urbanisierten Gebieten liegt zwischen 5 und 7, und für CU zwischen 6 bis 12 Fällen auf 100.000 Einwohnern pro Jahr (Hay and Hay, 1992). Dabei sind weiße Bevölkerungsgruppen häufiger als schwarze oder asiatische Bevölkerungsgruppen betroffen, wobei hier eine erhöhte Inzidenz bei der in

die USA emigrierten jüdischen Bevölkerungsgruppe besonders auffällig ist (Duerr *et al.*, 1998). Eine genetische Prädisposition für die CEDE lässt sich aus Konkordanzstudien ableiten. Es existieren Konkordanzen zum Ausbruch von CEDE bei Familienmitgliedern und monozygoten Zwillingen, Verwandte ersten Grades von CEDE-Patienten weisen demnach ein zehnfach erhöhtes Risiko auf an CEDE zu erkranken (Orholm *et al.*, 1991). Erst in den letzten Jahren wurden durch genetische Kopplungsanalysen zahlreiche genetische Loci (*IBD1-4*) identifiziert, die einen Ausbruch der Erkrankung begünstigen (Hugot *et al.*, 1996). Im Locus *IBD1* auf dem Chromosom 16 wurde durch Positionsklonierung (Hugot *et al.*, 2001) bzw. durch Kandidatengenanalysen (Ogura *et al.*, 2001) der genetische Faktor *NOD-2* (*CARD 15*) identifiziert; eine nachteilige Insertionsmutation in diesem Gen führt zu einem zwanzigfach erhöhten Risiko, an MC zu erkranken.

Bei den Umweltfaktoren wurde der Einfluss der luminalen Darmflora auf die Inzidenz von CEDE untersucht. Mausmodelle belegen, dass eine „spontane Kolitis“ durch Darmbakterien induziert werden kann, unter keimfreien Zuchtbedingungen jedoch nicht (Rath *et al.*, 2001; Elson, 1999). Im Gegensatz zur Darmflora spielen diätische Faktoren nur eine untergeordnete Rolle bei der Auslösung der Erkrankung. Allerdings übt das Rauchverhalten einen Einfluss auf die Inzidenz von CEDE aus. Während 80% der MC-Patienten Raucher sind, sind es bei CU nur 20%. Das Rauchen scheint also vor CU zu schützen, erhöht aber gleichzeitig das Risiko an MC zu erkranken (Cosnes *et al.*, 2001).

1.1.4 Ätiologie der CEDE

In den letzten Jahren deckten klinische Studien und Untersuchungen in Mausmodellen ein enormes Spektrum unterschiedlichster Faktoren und potentieller Agentien auf, die an den immunpathogenen Prozessen der CEDE beteiligt sind. Dennoch bleibt die zentrale Frage weiterhin unbeantwortet, ob CEDE durch inhärente defekte Immunmechanismen oder aber durch Immunreaktionen gegenüber luminalen Antigenen (Pathogene oder intestinale Mikroflora) ausgelöst werden (Strober *et al.*, 2002). Es mehren sich aber die Erkenntnisse, dass genetische Prädisposition und äußere Faktoren gleichermaßen für den initialen Ausbruch der Erkrankung von Bedeutung sind (Raedler und Schreiber, 1992). Das Schema in Abb. 1-2 fasst die derzeit in der Wissenschaft diskutierten Ansätze zur Erklärung der Ätiologie der CEDE zusammen, diese Ansätze werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden.

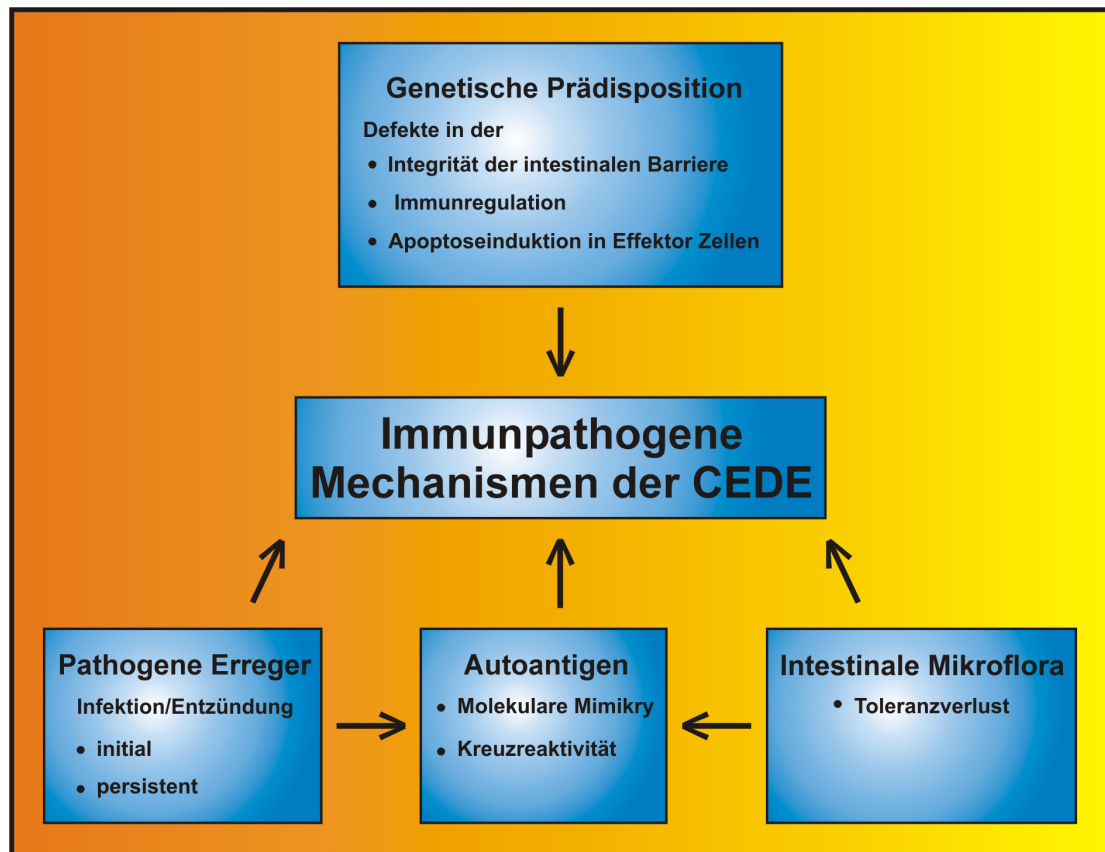


Abb. 1-2: Hypothesen zur Ätiologie von Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

1.1.4.1 CEDE als inhärente Erkrankung durch genetische Prädisposition

Der erfolgreiche Einsatz von Immunsuppressiva zur Behandlung von Rezidiven (Neurath und Stange, 2000), sowie die evidenten genetischen Prädispositionen in Patienten stützen die Hypothese, dass es sich bei CEDE um inhärente Erkrankungen des Immunsystems handelt. Das bereits beschriebene Gen Nod-2 kodiert beispielweise für einen Lipopolysaccharid-(LPS)-Rezeptor, der bei Bindung seines Liganden intrazellulär NF- κ B aktiviert. Der Funktionsmechanismus des LPS-Rezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch führt eine Insertionsmutation im NOD-2-Gen zur Produktion eines truncierten Rezeptors, wodurch die Immunregulation in MC-Patienten beeinträchtigt wird. Außerdem werden die T-Zellen resistent gegen Apoptoseinduktion, was zur Akkumulation von Effektor-T-Zellen und zur Perpetuierung der Entzündung führt (Ahmad *et al.*, 2002). Eine nachfolgende Studie zeigte jedoch an einem großen Patientenkollektiv, dass nur 20% aller MC-Patienten Träger von nachteiligen NOD-2-Allelen waren, darüber hinaus führt das Tragen dieses Allels nicht zwangsweise zum Ausbruch von MC (Lesage *et al.*, 2002).

Andere Mausmodelle belegen, dass auch eine Schädigung der Integrität der intestinalen Barriere gegenüber luminalen Antigenen einen Einfluss auf die Ätiologie der CEDE im Menschen ausüben könnte. So führt die Abwesenheit von trefoil-Peptiden in der Maus (Mashimo *et al.*, 1996) oder eine Veränderung der Integrität des Darmepithels durch die Expression von N-Cadherinen (Hermiston und Gordon, 1995) zur Auslösung einer chronischen Entzündung im Darm.

1.1.4.2 CEDE als infektiöse Erkrankung durch pathogene Erreger

Eine zweite Hypothese zur Erklärung der Ätiologie von CEDE besagt, dass eine Infektion mit enteropathogenen Erregern die Ursache der Erkrankung darstellt (Bargen, 1924). Eine Reihe von Mikroorganismen, z. B. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* oder Paramyxoviren wurden als ätiologische Agentien diskutiert (Linskens *et al.*, 2001). Insbesondere das *Mycobacterium tuberculosis* geriet unter Verdacht, ein auslösendes Agens für die CEDE darzustellen (Fiocchi, 1998). Jüngere Studien zeigten jedoch, dass dieser Erreger keine Rolle in der Ätiologie spielt (Hubbard *et al.*, 1999). Trotz intensiver Suche gelang es bisher nicht, bei CEDE-Patienten entsprechende enteropathogene Erreger zu isolieren. Aufgrund der mangelnden Nachweisbarkeit eines pathogenen Erregers wird eine perpetuierende chronische Infektion als Ursache für die CEDE heute weitgehend ausgeschlossen. Allerdings muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der eigentliche Erreger bisher nicht erkannt wurde, wie es auch für *Helicobacter pylori* bei Magengeschwüren lange Zeit der Fall war (Stallmach und Carstens, 2002).

Ein modernerer infektiöser Erklärungsansatz wird mit dem Begriff “hit-and-run“ umschrieben (Sartor, 1992). In dieser Hypothese löst eine, zu einem früheren Zeitpunkt erfolgte Infektion, eine chronisch andauernde Entzündungsreaktion aus. Zwar führen die initiierten inflammatorischen Reaktionen zur erfolgreichen Entfernung der Erreger aus dem Organismus, allerdings werden diese anschließend nicht abgeschaltet. Aufgrund einer gegebenen genetischen Prädisposition im Individuum perpetuieren die immunpathogenen Mechanismen und münden letztlich in die Entstehung einer CEDE, die Jahre nach der eigentlichen Infektion auftreten kann. In epidemiologischen Studien konnten solche Zusammenhänge für verschiedene enteropathogene Erreger nachgewiesen werden, beispielweise für *Yersinia enterocolitica* (Schumacher *et al.*, 1993).

Die Tatsache, dass sich in CU-Patienten erhöhte Titer von Autoantikörpern gegen körpereigene Antigene nachweisen lassen, führte zu der Vermutung, dass CEDE zumindest teilweise durch autoimmune Mechanismen vermittelt wird (Raedler und Schreiber, 1992; Seibold *et al.*, 1998). Seren von Patienten, die am Insulin-abhängigen juvenilen Diabetes mellitus (DM) oder am systemischen Lupus erythematosus (SLE) leiden, zeigen ähnlich erhöhte Titer an Autoantikörpern. Ebenso weist der chronische Verlauf dieser Erkrankungen große Parallelen mit dem von CEDE auf, auch hier führen die entzündlichen Prozesse zur Beschädigung bzw. zur Zerstörung des betroffenen Organs. Unwahrscheinlich ist allerdings, dass der initiale Auslöser von CEDE ein Autoantigen ist. Die zuvor genannten Indizien stützen eher die Hypothese, dass ein körperfremdes Antigen den initialen Auslöser der CEDE darstellt und es im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer Ausweitung bzw. Übertragung der Immunantwort auf ein sehr ähnliches körpereigenes Antigen mit hoher Homologie („Molekulare Mimikry“) kommt (Tučkova *et al.*, 1995). Durch die Infektion und die vorherrschenden unphysiologischen Bedingungen wird aufgrund einer bestehenden Kreuzreaktivität zwischen auslösendem Antigen und einem Autoantigen eine Immunantwort gegen das körpereigene Antigen initiiert und später aufrechterhalten, da aufgrund der Anwesenheit von „Danger Signals“ Toleranz- und Abschaltmechanismen nicht mehr korrekt funktionieren. Solch ein Mechanismus wird beispielsweise für DM angenommen. Hier finden sich im Blut von ca. 70% der Patienten Autoantikörper gegen die körpereigene Glutamatdecarboxylase (GAD). Diese GAD-Epitope weisen hohe Sequenzhomologien zu verschiedenen viralen Proteinen auf (z. B. Cocksackievirus B), andererseits liegt eine weitere Homologie zum ebenfalls körpereigenen Proinsulin-Protein vor. Es wird daher vermutet, dass lange vor dem Ausbruch des DM eine virale Infektion die Basis für die spätere autoimmune Zerstörung der β -Pankreas-Zellen schafft und dass ein Transfer der Immunantwort gegen das Cocksackie B-Virus zunächst auf das GAD-Epitop und später auch auf das Proinsulin-Epitop übertragen wird, da diese Epitope sich sehr ähnlich sind (Yoon und Jun, 2001). Im Zuge dieser „Kreuzreaktivität“ kommt es zur Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Pankreas-Zellen.

Es erscheint durchaus möglich, dass genetische Prädispositionen des Individuums die Abschaltung der autoimmunen Mechanismen erschweren könnten und somit beide Faktoren am Ausbruch der Erkrankung beteiligt sind. Die „hit-and-run“-Hypothese mit ihrer autoimmunen Komponente konkurriert mit einer dritten Hypothese, derzufolge die

CEDE einen Zusammenbruch der Toleranz gegenüber harmlosen luminalen Antigenen darstellt.

1.1.4.3 CEDE als Toleranzverlust gegenüber der intestinalen Darmflora

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die intestinale Mikroflora einen starken konditionierenden Effekt auf die Entwicklung, die Struktur und die Funktion des mukosalen Immunsystems ausübt, so wird die Sekretion von Zytokinen und damit die Entwicklung von Zellpopulationen im Darm beeinflusst (Nicaise *et al.*, 1999). Offensichtlich existiert auch zwischen der intestinalen Mikroflora und der Entstehung von CEDE ein kausaler Zusammenhang, so bricht MC initial vornehmlich im Ileum aus, welches die Region mit der höchsten Keimbeseidlungsrate im Dünndarm ist. Ein weiteres Indiz stellen keimfrei aufgezogene Mäuse dar, die über ein nur rudimentär entwickeltes mukosales Abwehrsystem verfügen. Werden solche Mäuse später mit Bakterien künstlich besiedelt, kommt es zu einer Entzündung des Darms (Kolitis), die zum Tod der Mäuse führt (Rolfe, 1984). Ebenso sind andere Mausstämme empfänglich für spontane Kolitisreaktionen, diese laufen aber nur in Anwesenheit, nicht aber in Abwesenheit luminaler Bakterien ab (Rath *et al.*, 2001; Elson, 1999). In solchen Mäusen lassen sich Immunreaktionen gegen luminale Antigene nachweisen, was auf einen Toleranzverlust gegenüber diesen hindeutet. Die Initiation der Erkrankung ist also eng mit dem Verlust der oralen Toleranz gegen harmlose Antigene der Darmflora und Nahrungsbestandteilen verbunden (Duchmann *et al.*, 1995) (s. auch Kap. 1.3.2.4). Dieser Toleranzverlust wird durch eine fehlerhafte Regulation von Immunantworten im Darm verursacht (Nakajima *et al.*, 1996; Monteleone, *et al.*, 2002) oder aber durch eine unzureichende Barrierewirkung des intestinalen Epithels (Soderholm *et al.*, 1999). Im weiteren Verlauf der Erkrankung bauen sich dann die zur Schädigung des Gewebes unangemessenen T-Zellantworten gegen harmlose Antigene auf.

Zur Zeit wird die Hypothese, dass die eigene Darmflora der Initiator für die Entzündungsprozesse im Darm ist, als wahrscheinlichste Erklärung für die Ätiologie der CEDE angesehen, da in fast allen Mausmodellen stützende Befunde für diese Hypothese gefunden werden (Strober *et al.*, 2002). Auch beim Toleranzverlust gegenüber luminalen Antigenen wird vermutet, dass durch Kreuzreaktivität übertragende Autoimmunreaktionen gegen Selbstantigene zum Krankheitsverlauf beitragen.

1.2 Der Gastrointestinaltrakt

1.2.1 Aufbau und Funktion

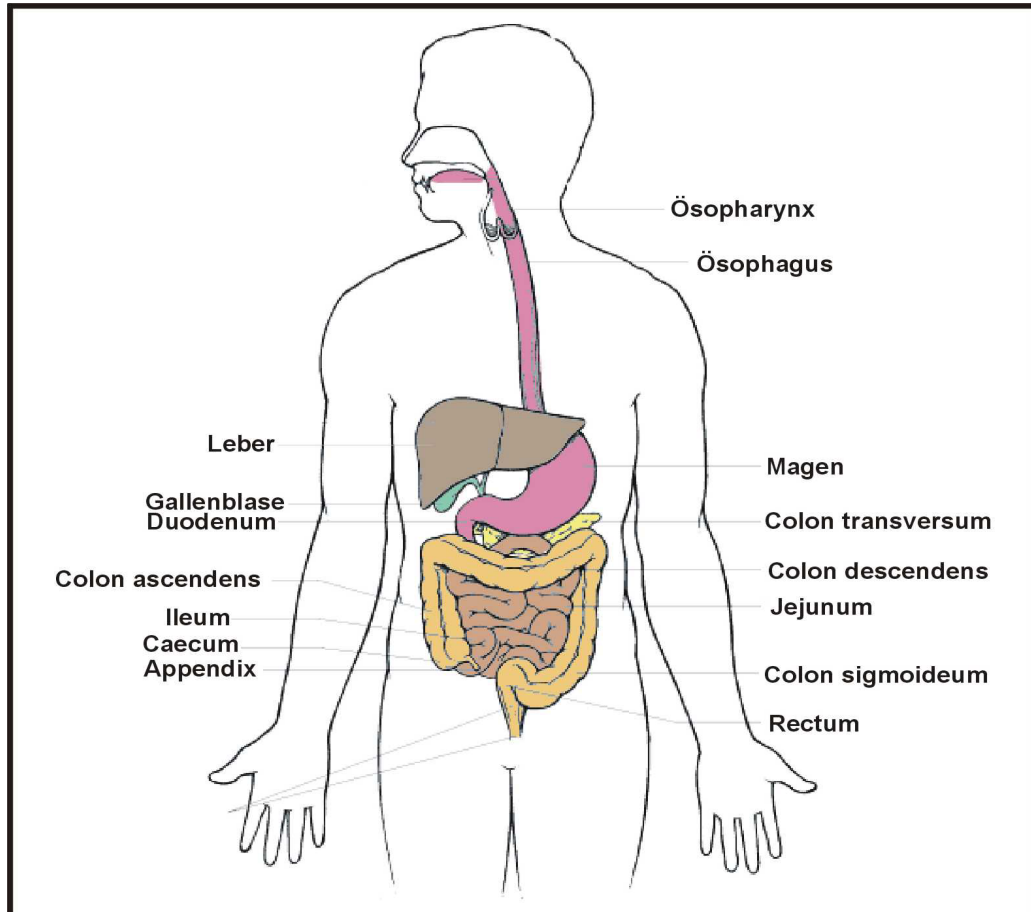


Abb. 1-3: Gastrointestinaltrakt des Menschen

Schematische Darstellung des menschlichen Gastrointestinaltraktes. Verändert übernommen von der „Crohn’s Colitis Foundation of America“ (<http://www.ccfa.org>).

Die primäre physiologische Funktion des Darms ist die Resorption und der Transport von Nährstoffbestandteilen aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf. Der Darm ist Bestandteil des gastrointestinalen Systems und lässt sich in Dünndarm und Dickdarm unterteilen. Abb. 1-3 stellt die wichtigsten Organe des Gastrointestinaltraktes und ihre Lage im Menschen schematisch dar. Die den Magen verlassende Nahrung erreicht den Dünndarm über das Duodenum, im weiteren Verdauungsprozess werden die aufgeschlossenen Nährstoffe im Jejunum und im Ileum durch die Enterozyten des Epithels resorbiert. Im Kolon wird den im Darmlumen befindlichen Ballaststoffen das Wasser entzogen, anschließend erfolgt die Ausscheidung über das Rektum.

Zur schnellen Verwertung der durch Enzyme aufgeschlossenen Nährstoffe verfügt der Darm sowohl über effiziente Transportsysteme zur Aufnahme benötigter

Makromoleküle, als auch über eine enorme Kontaktfläche. Mit einer Oberfläche von ca. 300m² beim Menschen (Neurath *et al.*, 2002) stellt das Darmepithel, und nicht etwa das Hautepithel die wesentliche Grenzfläche zum Außen dar.

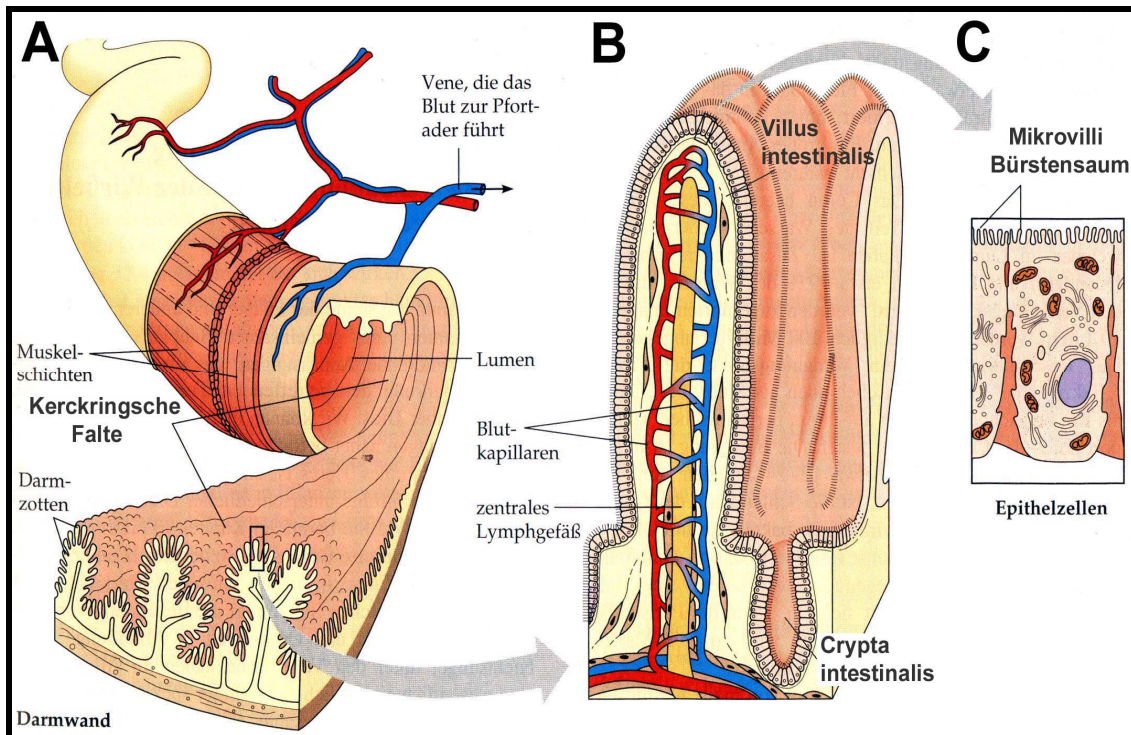


Abb. 1-4: Oberflächenvergrößerung im Darmepithel

Schematische Darstellung der Oberflächenvergrößerung des Darmepithels. (A) zeigt die Bildung von Kerckringschen Falten; (B) die Villi- und Kryptenbildung im Darmepithel und (C) den zellulären Bürstensaum (Mikrovillisaum). Entnommen aus dem Lehrbuch „Biologie“ von Neil A. Campbell aus dem Springer-Verlag.

Diese Oberflächenvergrößerung wird durch drei sich ergänzende strukturelle Prozesse erreicht, die in Abb. 1-4 grafisch dargestellt sind. Die optisch sichtbaren Auffaltungen des Darmes werden als Kerckringsche Falten bezeichnet (A) und tragen zur Oberflächenvergrößerung des Darmes ebenso bei wie die kleineren Strukturen der Villi (Villus intestinalis) und Lieberkühnschen Krypten (Cryptus intestinalis), die im gesamten Dünndarm als Einstülpungen in der Mukosaoberfläche zu finden sind (B). Zur Aufnahme der Nährstoffe in den Blutkreislauf wird jeder Villus von Blutkapillaren und einem zentralen Lymphgefäß durchzogen. Die Ausbildung eines Bürstensaums (Mikrovilli) auf der Oberfläche der Enterozyten hat aber den wesentlichsten Anteil an der Oberflächenvergrößerung (C), hierdurch vergrößert sich die Fläche des Darms um ein Zwanzigfaches.

Im Basalbereich des Epithels der Krypten befinden sich proliferierende Stammzellen, welche mittels Zellteilung ca. 400 neue Zellen pro Tag generieren. Die noch undifferenzierten Vorläuferzellen reifen während ihrer Migration in den distalen Bereich der Villi zu den verschiedenen benötigten Zelltypen des mukosalen Epithels aus. Durch mechanischen Verschleiß (Darmperistaltik) und enzymatischer Beschädigung der Zellen aufgrund auf sie einwirkender Verdauungsenzyme werden die Enterozyten nach einer durchschnittlichen Verweildauer von 3 bis 5 Tagen von den Villi abgestoßen und durch neu nachrückende Zellen ersetzt.

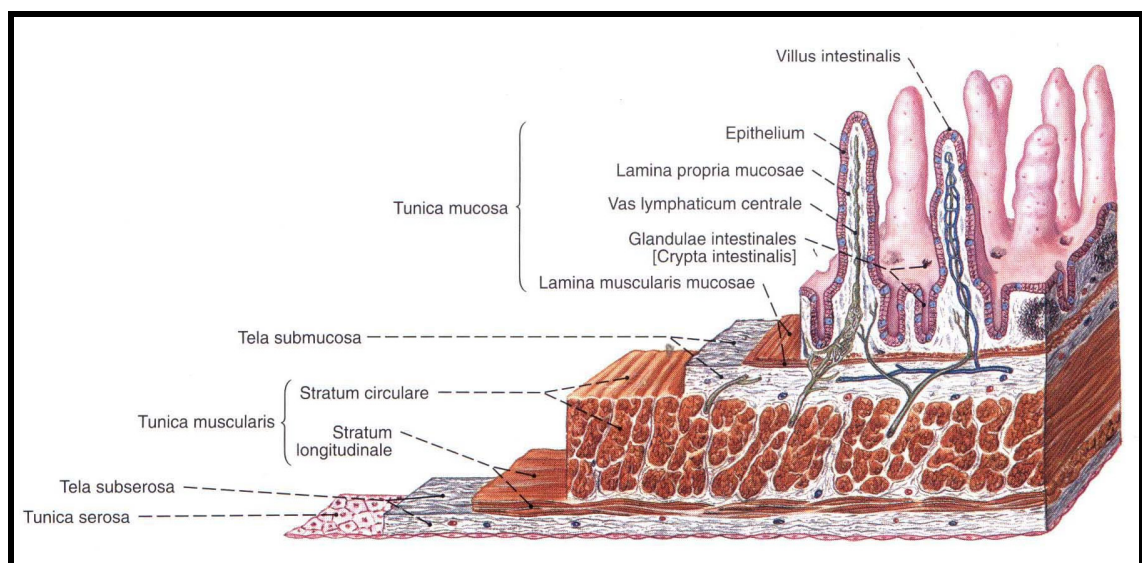


Abb. 1-5: Aufbau der Dünndarmwand

Abb. 1-5 zeigt den schematischen Anschnitt der menschlichen Dünndarmwand mit ihren einzelnen charakteristischen Gewebeschichten. Entnommen aus dem Lehrbuch „Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen“ aus dem Urban und Schwarzenberg-Verlag *et al.* (1992).

Histologisch ist der gesamte Darm nach einem einheitlichen Grundbauplan aus mehreren Gewebeschichten aufgebaut. Abb. 1-5 zeigt einen Anschnitt durch das Jejunum des Menschen und soll den Aufbau der Darmwand verdeutlichen. Zur Körperseite hin wird der Darm durch eine Scheidewand, der Serosa, abgegrenzt. Es folgt die Tunica muscularis, welche aus glatter Muskulatur besteht (Stratum circulare und Stratum longitudinale) und für die Kontraktionsbewegungen des Darmes notwendig ist. Es schließt sich eine weitere Bindegewebsschicht, die Tela Submucosa an, auf die nach innen die Tunica mucosa aufgelagert ist. Die Tunica mucosa setzt sich aus der Lamina muscularis mucosae, der Lamina propria mucosae und einer den Darm zur Lumenseite begrenzenden Epithelschicht zusammen. In der Lamina propria mucosae befindet sich das lymphatische, nervöse, arterielle und venöse Gefäßsystem. Diese

Gefäße durchziehen jeden einzelnen Villus und verbinden den Darm mit dem Mesenterium. Das einschichtige Epithel der Tunica mucosa besteht vornehmlich aus Enterozyten (85%) und Mucus-produzierenden Becherzellen (11%). Auf den Transport luminaler Antigene spezialisierte **M-Zellen** (engl. **Microfold-Cells**) sind nur im Bereich des Epithels von Lymphfollikeln zu finden (s. unten).

1.2.2 Intestinale bakterielle „Mikroflora“

Die intestinale Oberfläche und das Lumen des Dün- und Dickdarms ist von einer riesigen Anzahl mikrobieller Keime besiedelt, die auf ca. 10^{14} Keime geschätzt wird und sich aus ungefähr 400 unterschiedlichen Spezies zusammensetzt (Savage, 1979). An dieses komplexe Ökosystem hat sich die natürliche „Mikroflora“¹ durch Koevolution hervorragend angepasst, dabei ist die Keimdichte und Artenzusammensetzung vom jeweilig besiedelten Darmabschnitt abhängig (Henderson und Wilson, 1996), wobei die Bakterien die Epitheloberflächen des Darms und die passierenden Nahrungspartikel als Biofilm überziehen. Während im Duodenum aufgrund des niedrigen pH-Wertes sich nur wenige Bakterien ansiedeln ($<10^3$ KBE/ml)², steigt die Besiedlungsdichte vom Jejunum (10^3 - 10^4 KBE/ml) zum terminalen Ileum hin (10^7 - 10^8 KBE/ml). Dabei nimmt auch die Anzahl der Arten und der Anteil anaerober Bakterien zum Ileum hin stetig zu (Simon und Gorbach, 1984). Im Kolon erreicht die Keimbesiedlungsrate dann mit 10^{11} und 10^{12} KBE/g das Maximum.

Die hohe Adaption der Mikroflora an die physiologischen Umweltbedingungen des Darms, sowie die Vielfalt des Artenspektrums ermöglicht eine stabile Besiedlung des Darms, die es pathogenen Erregern erschwert, sich im Darmlumen oder an der Darmmukosa zu manifestieren und auszubreiten (Gorbach, 1982). So stellt eine intakte natürliche Darmflora den besten Schutz gegen eine Kolonisierung durch Candida-Pilze im Darm dar (Garcia-Lafuente *et al.*, 1998). Der intestinalen Mikroflora kommt eine bedeutende Barrierefunktion im Schutz des Darmepithels gegen pathogene Infektionen zu. Sie schützt die Mukosa gegen eindringende Pathogene durch Einnischung (Savage, 1983). Wahrscheinlich ist eine Vielzahl von Erkrankungen letztlich auf eine gestörte Mikroflora im Individuum zurückzuführen (Shanahan, 2000). In solchen Fällen wird die

¹ Aus historischen Gründen wurde in der Literatur an dem Begriff „Mikroflora“ festgehalten, was aus wissenschaftlicher Sicht nicht korrekt ist, da die Darmflora nicht dem Pflanzenreich zuzuordnen ist.

² Die Abkürzung KBE gibt die Anzahl der Keimbildenden Einheiten pro ml Stuhl im Dünndarm bzw. pro g Stuhl im Dickdarm an.

orale Toleranz des Organismus gegenüber den luminalen Antigenen der physiologischen Darmflora durchbrochen (s. Kap. 1.3.2.4).

Neben der Stärkung der Barrierefunktion übt die physiologische Darmflora auch zahlreiche weitere positive Effekte auf den von ihnen besiedelten Organismus aus. So können durch mikrobielle Enzyme Zuckerverbindungen aufgeschlossen werden, die ansonsten nicht für den Organismus nutzbar wären (Roberfroid *et al.*, 1995) und auch Vitamine werden durch Bakterien produziert. Darüber hinaus regen Darmbakterien die Durchblutung der Darmmukosa und die Mobilität des Darms an.

1.3 Das gastrointestinale Immunsystem

Aufgrund der enormen Epitheloberfläche des Darms und seiner hohen Keimbesiedlungsrate muss der Organismus eine hochwirksame Barrierefunktion gegenüber luminalen Antigenen aufbauen, um die Integrität des Organismus gegenüber potentiellen pathogenen Erregern, Mikroorganismen und Toxinen aufrecht zu erhalten. Dies führt zu der paradox anmutenden Situation, dass im Darm zwei diametral entgegengesetzte Funktionen ausgeübt werden: Einerseits muss die Aufnahme benötigter Nährstoffe erfolgen, andererseits müssen körperfremde luminal Antigen und potentielle Erreger abgewehrt werden. Pathogene Faktoren müssen mit hoher Selektivität eliminiert werden, während apathogene Substanzen und Bestandteile der Mikroorganismen der Darmflora toleriert werden müssen.

Als Konsequenz hieraus hat sich ein komplexes Darmimmunsystem entwickelt, welches unter physiologischen Bedingungen in der Lage ist, einen strikt geregelten Gleichgewichtszustand im Organismus aufrechtzuerhalten. Dies gelingt, weil regulatorische Mechanismen eine überschießende Immunreaktion verhindern und dennoch die Fähigkeit zur schnellen, adäquaten Immunantwort im Bedarfsfall aufrechterhalten bleibt. Zu diesem Zweck haben sich im Laufe der Phylogenese im Darm Strukturen entwickelt, die diese Funktionen wahrnehmen. Sie lassen sich in mechanische Barrieren, unspezifische Abwehrmechanismen und das wesentlich komplexere Darm-assoziierte Immunsystem (GALT) unterteilen.

1.3.1 Barrieren und unspezifische Abwehrmechanismen

Eine wesentliche Rolle in der Barrierefunktion des Darmes kommt dem vornehmlich aus Enterozyten bestehenden Epithel zu (Podolsky, 1999). Obwohl das intestinale

Epithelium nur aus einer einzigen Zellschicht besteht, wird der Eintritt von Antigenen strikt kontrolliert und deren irregulärer Zutritt verhindert. Stark adhäsive Zell-Zellkontakte, sogenannte „Tight Junctions“ (engl. feste Verbindungen) schweißen die Enterozyten untereinander eng zusammen und verwehren auch sehr kleinen Molekülen den Durchtritt durch die Darmwand (Madara, 1998). Diese „Tight Junctions“ bilden die sogenannte „Zonula occludens“, die aus einem Ring von Occludin- und Claudin-Proteinen besteht und das apikale Epithel versiegelt.

Eine dem Epithel aufgelagerte Mucusschicht bildet eine zusätzliche mechanische Barriere, die in Form von Proteoglykanen von „Becherzellen“ produziert wird. Zusätzliche sezernierte antimikrobielle Peptide, wie beispielweise Defensine (Ayabe *et al.*, 2002) oder trefoil-Peptide (Wong *et al.*, 1999) wehren durch ihre bakteriostatische Wirkung weitere potentielle Erreger ab. Sezernierte IgA-Antikörper übernehmen ebenfalls eine wichtige Funktion in der unspezifischen Erregerabwehr (s. Kap. 1.3.2.2.2).

Ein weiterer unspezifischer Abwehrmechanismus ist die spontane Diarrhö als Antwort auf z. B. Salmonellen oder dem Verzehr von verdorbenen Lebensmitteln. Durch Steigerung der Wasserzufuhr und der Darmperistaltik kommt es zur raschen Entleerung des Darmlumens, was zur Elimination von Krankheitserregern führt.

1.3.2 Das Darm-assoziierte spezifische Immunsystem

Neben den mechanischen und chemischen Barrieren hat sich im Laufe der Evolution ein zelluläres Darmimmunsystem entwickelt (Bienenstock und Perey, 1972). Das GALT umfasst mit Ausnahme der Milz mehr Lymphozyten als jedes andere sekundäre Lymphorgan (Beagley und Elson, 1992). Im Gegensatz zum systemischen T-Lymphozytensystem entwickelt sich ein Teil der T-Zellen des GALT thymusunabhängig und unterliegt somit keiner Negativselektion. Daher umfasst das GALT auch potentiell autoreaktive T-Zellen, die zur Verhinderung autoreaktiver Prozesse lokal supprimiert werden müssen (Adler, 1996).

Das GALT unterteilt sich in zwei räumlich und funktionell voneinander getrennte Kompartimente. Im induktiven Teil des GALT, der sich aus den organisierten lymphoiden Strukturen der Peyerschen Plaques (PP) und der Lymphfollikel (LF) zusammensetzt, werden Immunantworten gegen luminale Antigene initiiert (s. Kap. 1.3.2.1). Aktivierte Lymphozyten wandern über die Venolen in die mesenterischen

Lymphknoten ein, von wo aus sie über den Blutkreislauf in die Lamina propria und das Epithel einwandern können. Die Zielkompartimente der Lamina propria und des Epithelium intestinalis werden als efferenter Teil des GALT bezeichnet. Hier üben die diffus verteilten Lamina Propria- (LPL) und intestinale epitheliale Lymphozyten (IEL) zusammen mit ebenfalls anwesenden Makrophagen und Granulozyten ihre entsprechenden spezifischen Effektorfunktionen aus (s. Kap.1.3.2.3).

1.3.2.1 Das induktive GALT

1.3.2.1.1 Aufnahme luminaler Antigene im Peyerschen Plaque

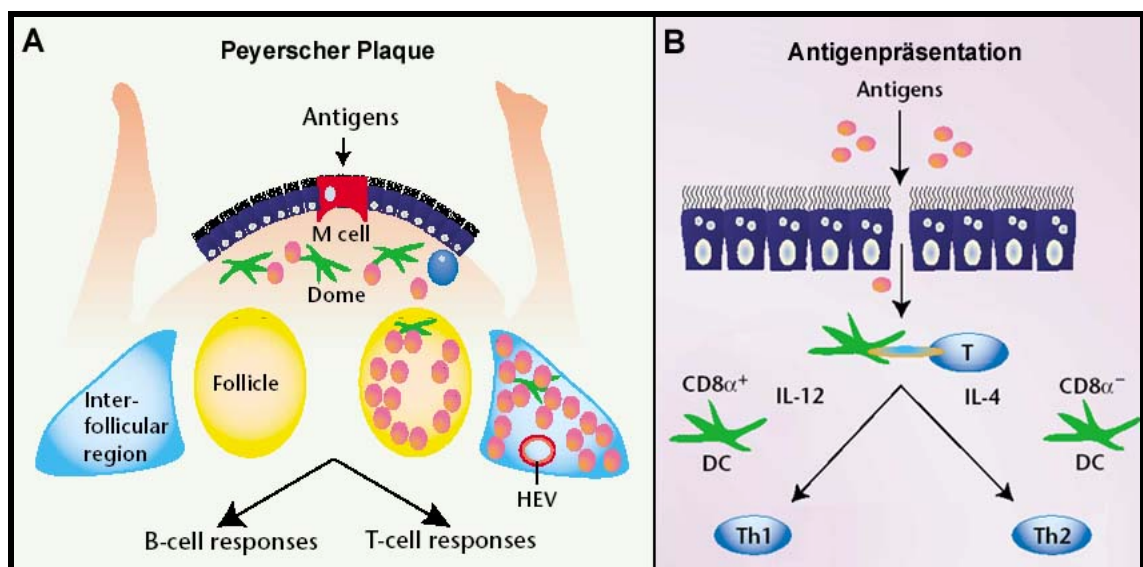


Abb. 1-6: Antigenpräsentation im Peyerschen Plaque

Abb. 1-6A zeigt den schematischen Aufbau eines Peyerschen Plaques. Luminale Antigene werden über M-Zellen in die subepitheliale Domregion transportiert und dort von professionellen APC den T-Zellen präsentiert. B-Zell- und T-Zellantworten werden in den Follikeln und den interfollikulären Bereichen initiiert, anschließend verlassen die Lymphozyten den Lymphfollikel über Venolen (HEV – Human Endothelial Venules). Abb. 1-6B zeigt ein hypothetisches Modell, nach dem ein im Darm vorherrschendes Zytokinprofil den Phänotyp von Dendritischen Zellen beeinflusst ($CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$) und die von ihnen ausgelöste Immunantwort (T_H1 oder T_H2) diktiert. Verändert nach Neurath *et al.* (2002).

Die primäre Funktion von PP³ in der Darmmukosa ist die Aufnahme und die Präsentation von Antigenen gegenüber naiven T- und B-Lymphozyten, um eine adäquate Immunantwort auszulösen (Abb. 1-6A). Zur Aufnahme luminaler Antigene enthält das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) der PP transzytotisch aktive M-Zellen, die einen Anteil von ca. 10% am FAE stellen. M-Zellen verfügen über eine nur sehr dünne Glykokalyxschicht und weisen kurze, aber stark verzweigte Mikrovilli auf, mit denen

³ Im weiteren Verlauf des Textes wird explizit nur noch auf die PP eingegangen werden, alle beschriebenen Aussagen und Eigenschaften treffen jedoch auch für die LF zu.

sie effizient Makromoleküle und Mikroorganismen aufnehmen können (Owen, 1974; Fujimura und Owen, 1996). Während des transzytotischen Prozesses bleiben die Antigene unverändert und werden in die unter den M-Zellen liegende subepitheliale Domregion des PP transportiert, wo sie von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) bzw. Dendritischen Zellen (DC) endozytiert werden (Neutra *et al.*, 1998; Kucharzik *et al.*, 2000). Erst innerhalb der professionellen Antigen-präsentierenden Zellen erfolgt die Prozessierung der luminalen Antigene (Pappo, 1991).

Eine weitere Möglichkeit der Antigenaufnahme wird direkt von DC wahrgenommen. Sie sind in der Lage, die „Tight Junctions“ zwischen den Enterozyten aufzubrechen und mit ihren in das Darmlumen hineinreichenden Pseudopodien Antigene und Mikroorganismen direkt zu endo- bzw. phagozytieren (Rescigno *et al.*, 2001). Beim Zurückziehen der DC in den subepithelialen Dombereich bleibt die Integrität der Darmbarriere erhalten.

Eine dritte, allerdings irreguläre Möglichkeit zum Eintritt luminaler Antigene stellt die Penetration der Darmbarriere dar. Solch eine Penetration kann durch eine akute Infektion provoziert werden. Durch die Freisetzung von Toxinen, durch unspezifische Abwehrmaßnahmen gegen den Erreger oder durch eingeleitete Reparaturmaßnahmen wird das Gewebe des Darmepithels geschädigt, und somit die Integrität der intestinalen Darmbarriere eingeschränkt (Blumberg und Strober, 2001). Als Folge gelangen luminal Antigene unkontrolliert in die efferenten Bereiche des GALT, in denen sich neben den spezifischen IEL und LPL auch Antikörper-sezernierende Plasmazellen, Makrophagen und eosinophile Granulozyten befinden. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren wie IL-1 und TNF- α durch Makrophagen übernehmen all diese Zelltypen wesentliche Effektorfunktionen in der Immunabwehr. Aufgrund des konzertierten Zusammenwirkens aller an der Abwehr beteiligten Zelltypen wird eine akute Entzündung ausgelöst (Blumberg und Strober, 2001).

1.3.2.1.2 Präsentation luminaler Antigene

Die Präsentation luminaler Antigene wird von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen übernommen, zu denen aufgrund ihrer konstitutiven MHC-II-Expression Makrophagen, B-Lymphozyten und DC gezählt werden. DC grenzen sich jedoch von den anderen APC durch die besonders hohe Expression von MHC-II-Molekülen und weiteren kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche ab, womit sie die

potentesten Stimulatoren primärer Immunantworten darstellen (Banchereau und Steinman, 1998). Mehrere Studien belegen, dass auch im PP DC die entscheidende Rolle bei der Initiation einer primären Immunantwort spielen (Moser und Murphy, 2000; Iwasaki und Kelsall, 1999a).

Unreife und ausgereifte DC repräsentieren dabei unterschiedliche Entwicklungsstadien des gleichen Zelltyps (Steinman, 1991). Zur Überwachung des Gewebes hinsichtlich des Eindringens fremder Erreger endozytieren unreife DC fortwährend luminale Antigene aus ihrer lokalen Umgebung, und prozessieren und präsentieren diese auf ihrer Oberfläche. Die Anwesenheit entzündlicher Mediatoren, beispielsweise bakterielles LPS oder TNF- α , aktiviert die DC in der Lamina propria. Daraufhin wird die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen massiv erhöht, was zu einer Steigerung ihrer Fähigkeit führt, naive T_H0-Zellen spezifisch zu aktivieren (Mellman *et al.*, 1998).

Über den Mechanismus, welcher den Organismus dazu befähigt, zwischen den verschiedenen Immunantworten „auszuwählen“, wird in der Literatur heftig diskutiert (Nagler-Anderson, 2001). Die derzeitig schlüssigste Hypothese besagt, dass der Kontext der Präsentation auf den APC, vor allem auf den DC, darüber entscheidet, welcher Typ von T-Helferzellen sich entwickelt, und welche Immunantwort damit ausgelöst wird (Akbari *et al.*, 2001). So macht es für die Initiation der Immunantwort einen entscheidenden Unterschied, ob die präsentierenden DC sich im unreifen oder aber ausgereiften aktivierten Zustand befinden (s. Kap. 1.3.2.2).

Auch konnten im Maussystem CD8 α -positive und CD8 α -negative DC-Subpopulationen nachgewiesen werden (Moser und Murphy, 2000), die scheinbar unterschiedliche Funktionen bei der Initiation von Immunantworten übernehmen (Abb. 1-6B). CD8 α -negative DC induzieren humorale T_H2-Antworten, während CD8 α -positive DC zelluläre T_H1-Antworten auszulösen (Pulendran *et al.*, 2001). In den PP befinden sich überwiegend CD8 α -negative DC, was zum dort vorherrschenden T_H2-Zytokinprofil unter physiologischen Bedingungen führt. Durch Verabreichung bakterieller Antigene kann aber die Expression von CD8 α -Molekülen auf der Oberfläche von DC induziert werden, woraufhin die DC sich zu potenten Stimulatoren von T_H1-Antworten entwickeln (Moser und Murphy, 2000). Es bleibt bislang ungeklärt, wie es zur Entwicklung dieser funktionell unterschiedlichen DC-Populationen kommt. Der Einfluss des mukosalen Milieus auf die Differenzierung von DC sowie die

molekularen Mechanismen, die zum Umschalten der DC von tolerogener auf inflammatorischer Präsentation führen, müssen noch tiefergehend untersucht werden. Es wird auch diskutiert, ob intestinale Epithelzellen (IEC) unter bestimmten Umständen zur Präsentation von Antigenen fähig sind (Pitman und Blumberg, 2000). Diverse Antigenrezeptoren, wie beispielweise $Fc\gamma_n$ -(Fibronectin)-Rezeptoren wurden auf der apikalen Oberfläche von IEC nachgewiesen (Israel *et al.*, 1997). IEC sind in der Lage, Makromoleküle zu endozytieren (Gonnella und Wilmore, 1993), wenn auch ihre Fähigkeiten zur Prozessierung eingeschränkt sind. Studien belegen aber, dass die Fähigkeit der IEC zur Stimulation von Lymphozyten im Vergleich zu professionellen APC nur gering ist (Bland und Kambarage, 1991). Diese verringerte Stimulationskapazität ist darauf zurückzuführen, dass IEC nur über geringe Mengen der zur Präsentation notwendigen MHC-Moleküle verfügen. Außerdem sind unter physiologischen Bedingungen keine kostimulatorischen B7-Moleküle nachweisbar, eine Präsentation unter solchen Bedingungen führt folglich generell zu einer Toleranzinduktion. Während einer Entzündungsreaktion lassen sich aber B7-Moleküle und höhere Expressionsniveaus an MHC-Molekülen in den IEC induzieren (Steiniger *et al.*, 1989). Unter diesen Bedingungen können IEC tatsächlich einen wesentlichen Beitrag zur Aktivierung von spezifischen Lymphozyten leisten, den professionellen APC Unterstützung gewähren und die Immunantwort gegen eindringende Erreger verstärken.

IEC präsentieren auch nicht-klassische Antigene auf MHC-I-ähnlichen Molekülen (Shao *et al.*, 2001). Sie präsentieren Lipopolysaccharide und Glykoproteine auf CD1-Molekülen und dies in unmittelbarer Nähe von IEL, deren eingeschränktes TCR-(T Cell Receptor)-Repertoire gerade für solche Motive empfänglich ist (s. Kap. 1.3.2.3.2). IEC können folglich durch die Interaktion mit den IEL dem Organismus sehr schnell den Beginn einer Infektion übermitteln.

1.3.2.2 Initiation einer spezifischen Immunantwort

In der Domregion des PP präsentieren DC naiven CD4-positiven Lymphozyten (T_H0 -Zellen) luminale Antigene. Bei passender Antigenspezifität differenzieren die naiven T-Zellen zu den verschiedenen T-Helfer-Subtypen aus. Abb. 1-7 stellt die Aktivierung und Ausdifferenzierung von naiven T_H0 -Zellen in T_H1 -Zellen ($T_{Helfer1}$ -Zellen), T_H2 -Zellen ($T_{Helfer2}$ -Zellen) und T_H3 -Zellen ($T_{Helfer3}$ -Zellen) dar. Unter der subepithelialen Dom-Region liegen mehrere B-Zellfollikel, welche von interfollikulären Bereichen

umschlossen sind, in denen die aktivierten T-Helfer-Zellen einwandern (Iwasaki und Kelsall, 1999b). In den mit T-Zellen angereicherten interfollikulären Bereichen und den B-Zellfollikeln findet die Initiation der Immunantwort statt, wo inhibitorische und inflammatorische Antworten gegen luminale Antigene ausgelöst werden.

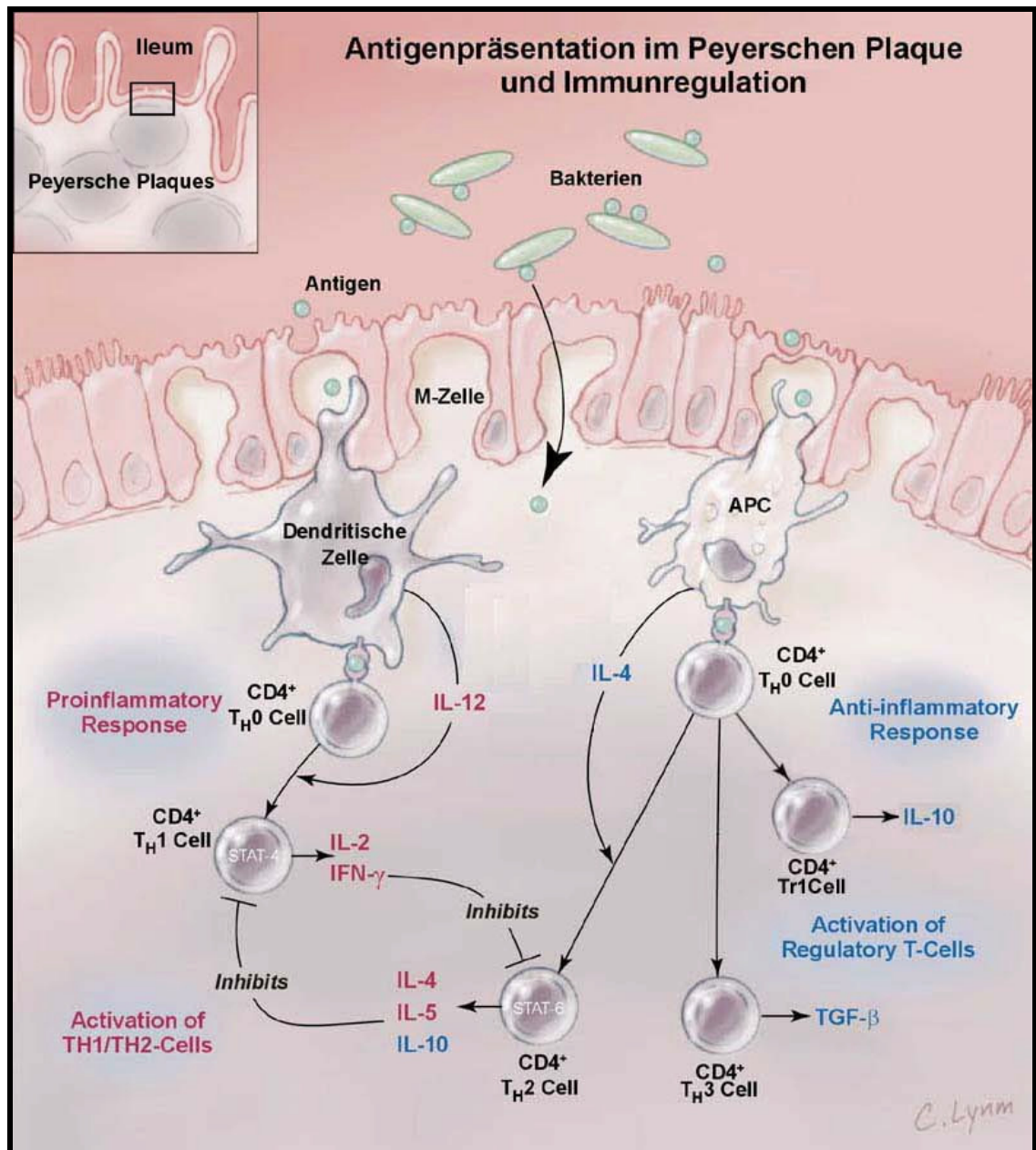


Abb. 1-7: Immunregulation im Peyerschen Plaque

Im Schema ist die Differenzierung naiver T_H0-Zellen in die verschiedenen T-Helfer-Zelltypen beschrieben. Eine ausführliche Schilderung dieser Differenzierungsvorgänge, der aus ihnen resultierenden Zellpopulationen und ihrer Funktionen findet sich im Text. Entnommen und verändert nach Blumberg und Strober (2001).

Die Aktivierung naiver T_H0 -Zellen im GALT erfordert die Aktivierung über zwei unabhängige Signale⁴, welche auf der Oberfläche von DC in Form von MHC- und kostimulatorischen Molekülen zur Verfügung stehen. Das erste Signal wird durch die Ligation des spezifischen T-Zellrezeptors mit dem passenden Peptid-beladenen MHC-Molekülen in die T-Zellen übermittelt, das zweite Signal stammt aus der Interaktion von CD80 und CD86 mit dem CD28-Korezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen (Guinan *et al.*, 1994). Eine Hemmung dieser spezifischen Ligand-Wechselwirkungen kann eine mukosale Entzündungsreaktion sogar unterdrücken, wie verschiedene Arbeiten belegen (Liu *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 1999). Gewöhnlich antworten T_H0 -Zellen auf die ausschließliche Aktivierung über den TCR mit Anergie, die zur Apoptose-vermittelten peripheren Deletion führen kann (Chen *et al.*, 1995). Dies gilt allerdings nicht für bestimmte Subpopulationen von CD8-positiven IEL, die gesonderte Subpopulationen von T-Zellen darstellen, die sich thymusunabhängig entwickeln und ungewöhnliche Eigenschaften aufweisen (s. Kap. 1.3.2.3.2).

T_H1 -Zellen führen zur Auslösung einer zellulären, T_H2 -Zellen zur Unterstützung einer humoralen Immunantwort (Mosmann *et al.*, 1986). Dabei inhibieren sich T_H1 - und T_H2 -Zellen gegenseitig durch die Ausschüttung von Zytokinen. So hemmt das Zytokin IL-10 die Auslösung einer zellulären Antwort, während das Zytokin IFN γ die Auslösung einer humoralen Antwort unterdrückt.

Tab. 1-2: Zytokinexpression CD4-positiver T-Zellsubpopulationen

Die Tabelle stellt die Zytokinexpression der im Darm induzierten verschiedenen Populationen von T_{Helfer} -Zellen dar. Deren Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren sowie die jeweils von ihnen vermittelten Immunantworten werden aufgeführt (DTH- delayed type hypersensitivity); zitiert nach (Weiner, 2001).

Zytokinprofil	Th1	Th2	Th3	Tr1
IFN- γ	+++	-	+/-	+
IL-4	-	+++	+/-	-
TGF- β	+/-	+/-	+++	++
IL-10	-	++	+/-	+++
Wachstumsfaktor	IL-2	IL-2/IL-4	TGF- β	IL-10
T-Zell-Hilfe	DTH	IgG	IgA	?
Suppression	Th2	Th1	Th1/Th2	Th1

⁴ Der Ausdruck „Signal“ wird in diesem Textabschnitt als Vereinfachung genutzt. Tatsächlich müssen zur Aktivierung einer T-Zelle ca. 1.000 bis 2.000 TCR auf ihrer Oberfläche durch spezifische MHC-Peptid-Liganden aktiviert werden.

Erst in den letzten Jahren wurden die regulatorischen T-Zellen (T_H3 -Zellen oder Tr1-Zellen) entdeckt (Groux *et al.*, 1997). Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, zelluläre und/oder humorale Immunantworten herunterzuregulieren bzw. abzuschalten. Im Darm sind sie an der Induktion oraler Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen beteiligt (Weiner, 2001). In den drei nachfolgenden Kapiteln sollen die in Tab. 1-2 zusammengefassten Eigenschaften und Funktionen der im Darm induzierten T-Zellsubpopulationen differenzierter betrachtet werden.

1.3.2.2.1 Inflammatorische T_H1 -Immunantwort

Aufgrund der Anwesenheit entzündlicher Mediatoren, beispielweise bakterieller Lipopolysaccharide oder $TNF-\alpha$, werden die DC der Lamina propria aktiviert und steigern ihre Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen massiv (Mellman *et al.*, 1998). Diese kostimulatorischen Moleküle stellen das zweite zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen notwendige Signal zur Verfügung, dazu reagieren sie mit ihren Liganden auf der Oberfläche von T-Zellen. Aufgrund dieser kostimulatorischen Ligandinteraktionen sind aktivierte DC in der Lage, naive Antigen-spezifische T-Zellen effizient zu stimulieren. Das von DC sezernierte inflammatorisch wirkende IL-12 drängt naive T-Zellen in die Ausdifferenzierung zu aktivierten T_H1 -Zellen (Szabo *et al.*, 1995; Magram *et al.*, 1996). Als Folge kommt es zur Ausschüttung von $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ durch die aktivierten T-Zellen. Dieses hemmt einerseits die Entwicklung von T_H2 -Zellen und führt andererseits zur Aktivierung von Makrophagen der Lamina propria, die darauf mit der Produktion von $TNF-\alpha$ und IL-1 reagieren.

Auf diese Weise kommt es zur Aktivierung cytotoxischer T-Zellen und unspezifischer Phagozyten, der Ausschüttung von Histaminen durch Mastzellen, was zur Anlockung weiterer Leukozyten führt. In Folge dessen wird ein akuter Entzündungszustand ausgelöst, der zur Gewebeerstörung im Darmepithel, und somit zu einer weiteren Penetration des Darmepithels durch luminale Antigene führen kann.

1.3.2.2.2 Humorale T_H2 -Immunantwort

Unter physiologischen Bedingungen sezernieren DC die Zytokine IL-4 sowie in geringen Mengen die immunsupprimierenden Zytokine IL-10 (Asseman und Powrie, 1999) und $TGF-\beta$ (Powrie *et al.*, 1996), womit eine antiinflammatorische Immunantwort ausgelöst wird (Iwasaki *et al.*, 1999), die zur Generierung von

aktivierten T_H2 -Zellen führt. Das Zytokin IL-4 treibt naive T-Zellen (T_H0 -Zellen) in die Differenzierung zu T_H2 -Zellen. Diese leisten T-Zell-Hilfe bei der Auslösung humoraler B-Zellantworten in den Follikeln und fördern durch die Freisetzung großer Mengen an IL-4 und IL-5 die Produktion von Antikörpern. Aktivierte B-Lymphozyten wandern letztlich in die Lamina propria ein, wo sie als Plasmazellen neutralisierende IgA-Antikörper in großen Mengen produzieren (van Ginkel *et al.*, 1999).

Unter physiologischen Bedingungen kommt den IgA-Antikörpern bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere eine herausragende Bedeutung zu, da sie den Großteil luminaler Antigene von der Penetration des Darmepithels abhalten. Dabei entfalten sie im Gegensatz zu IgG-Antikörpern keine proinflammatorische Wirkung (Farstad *et al.*, 2000), womit vermutlich die empfindliche Schleimhautstruktur des Darms geschützt werden soll. Tatsächlich wird zur Produktion von IgA-Antikörpern sogar immunsupprimierendes TGF- β benötigt, welches vornehmlich von regulatorischen T_H3 -Zellen sekretiert wird (Cazac und Roes, 2000).

Die als Dimere sezernierten Antikörper binden an den konstitutiv exprimierten polymeren Immunglobulinrezeptoren (pIGR) an der basolateralen Seite der Enterozyten und werden mittels Transzytose zur apikalen Seite transportiert (Allen *et al.*, 1973). Dort werden die IgA-Antikörper enzymatisch freigesetzt, um sich in die Proteoglykan-haltige Mucusschicht einzulagern. Durch diese Prozesse können einerseits luminal Antigene direkt vom Eindringen ins Epithel abgehalten werden und andererseits bereits in die Lamina propria eingedrungene Antigene durch Bindung an die IgA-Antikörper entfernt werden (Kaetzel *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 2001).

1.3.2.2.3 Regulatorische T_H3 -Immunantwort

Es wird zunehmend deutlich, dass auch unter physiologischen Bedingungen fortwährend Immunantworten gegen mukosale bakterielle Antigene ausgelöst werden. Neben der zuvor beschriebenen protektiven und antiinflammatorischen Sekretion von IgA-Antikörpern werden auch fortwährend regulatorische T-Zellen induziert, deren Funktion die Beruhigung und Abschaltung inflammatorischer Reaktionen zu sein scheint (Sakaguchi, 2003; Maloy and Powrie, 2001).

So führt die konstitutive Expression von TGF- β durch DC in den Peyerschen Plaques neben der Entwicklung von T_H2 -Zellen auch zur Bildung aktiv immunsuppressiver T_H3 -Zellen (Weiner, 2001). Bei Erkennung ihres spezifischen Antigens produzieren die entstehenden T_H3 -Zellen TGF- β in großen Mengen und inhibieren damit unspezifisch

inflammatorische Immunantworten (Chen *et al.*, 1994; Pardoux *et al.*, 1997). Zusätzlich steigert das ausgeschiedene TGF- β auch die Produktion von IgA-Antikörpern durch B-Lymphozyten. Ebenfalls könnte eine APC-T_H3-Interaktion der Schlüssel zur Regulation von T-Zellen sein, indem APC von den regulatorischen T_H3-Zellen abgeschaltet werden, wie es im SCID-Transfer-Kolitis-Modell für Ox40-positive DC vermutet wird (Malmstrom *et al.*, 2001). Speziell dem Zytokin TGF- β kommt bei der Suppression von Immunantworten eine wesentliche Rolle zu, da sich sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen distinkte, von IL-10-produzierenden T_H2-Zellen unterscheidbare TGF- β -produzierende T-Zellen entwickeln (Fukaura *et al.*, 1996; Powrie *et al.*, 1996).

Ein ähnlicher Mechanismus wurde für regulatorische T_R1-Zellen beschrieben (s. Kap. 1.4.1.2), welche IL-10 und in geringeren Maßen auch TGF- β sezernieren und inhibitorisch auf T_H1-Immunantworten wirken (Groux *et al.*, 1997; Cottrez *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 2002). CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen stellen eine weitere Population regulatorischer T-Zellen dar, die sich bereits im Thymus entwickelt und von den T_H3-Zellen und T_R1-Zellen darin unterscheidet, dass ihre immunsuppressive Wirkung von Zellkontakten und weniger von Zytokinen abhängig ist (Sakaguchi *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2001). In Transfermodellen konnte ein Kotransfer dieser Zellen bei SCID-Mäusen eine Entzündung des Darms verhindern (Read *et al.*, 2000).

Es muss noch genauer untersucht werden, welche Zusammenhänge zur Entwicklung dieser inhibitorischen bzw. regulatorischen T-Zellpopulationen führen, in jedem Fall nehmen die regulatorischen T-Zellpopulationen eine Schlüsselposition bei der Induktion oraler Toleranz (s. Kap. 1.3.2.4) ein (Cong *et al.*, 2002).

1.3.2.3 Effektor-Zellen des GALT

Die Stimulation von Lymphozyten im induktiven Teil des GALT durch Antigene aus Nahrungsbestandteilen oder intestinaler Mikroflora führt automatisch zur Anwesenheit spezifischer, immunkompetenter Zellen in der gastrointestinalen Schleimhaut (Salmi und Jalkanen, 1999). Aktivierte Lymphozyten gelangen über die mesenterischen Lymphknoten in die efferenten Bereiche des GALT, wo sie als diffus verteilte IEL und LPL neben den ebenfalls in Lamina propria vorhandenen Makrophagen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten die Effektorzellen des GALT darstellen.

Die zielgerichtete Wanderung („homing“) der Lymphozyten zwischen lymphoiden Organen und der Lamina propria ist Bestandteil einer effektiven Immunantwort. Verantwortlich für diese zielgerichtete Migration ist die Expression von

Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Lymphozyten (L-Selektin, LFA-1) und des Endothels (E-Selektin, ICAM-1), die ihnen den Eintritt in die Lamina propria und anschließend ins intestinale Epithel ermöglichen (Berlin *et al.*, 1993; Bargatze *et al.*, 1995).

Vaskuläre Addressine, die auf Endothelzellen exprimiert werden, sind sowohl für die selektive Migration der Effektor-Lymphozyten in die Mukosa als auch für deren Transmigration durch das Endothel verantwortlich. Auf dem Endothel der Mukosa wird selektiv MadCAM-1 (**M**ucosal **A**ddressin **C**ell **A**dhesion **M**olecule-1) exprimiert (Briskin *et al.*, 1993). Dieses Adressin erlaubt es den Leukozyten, über das auf ihrer Oberfläche exprimierte $\alpha_4\beta_7$ -Integrin zu binden und durch das Endothel hindurch in die Mukosa einzutreten (Ruiz-Velasco *et al.*, 2000).

Tab. 1-3: Expression von Oberflächenmolekülen auf LPL und IEL

Tab. 1-3 vergleicht die Frequenz der Expression von T-Zellrezeptoren, kostimulatorischen Molekülen, Aktivierungsmarkern und Gedächtnismarkern zwischen LPL und IEL mit peripheren Blut-Lymphozyten. Eine Steigerung der Expressionshäufigkeit in den IEL bzw. LPL wurde durch ein (+), eine Verringerung durch ein (-) und eine gleichbleibende Expressionsfrequenz durch ein (=) gekennzeichnet. Verändert nach Köhne *et al.* (1999).

Oberflächenmolekül	LPL	IEL
$\alpha:\beta$ -T-Zellrezeptor	=	-
$\delta:\gamma$ -T-Zellrezeptor	=	++
CD4	=	--
CD8	=	++
CD45 R0	+++	+++
CD45 RA	--	--
CD11a/CD18	-	-
CD11b/CD18	-	-
CD62L	--	?
CD25	++	++

IEL verfügen zusätzlich über $\alpha_E\beta_7$ -Integrine auf ihrer Oberfläche. Diese ermöglichen ihnen die Bindung an E-Cadherin-Molekülen, welche auf IEC exprimiert werden (Kilshaw und Murant, 1990; Lefrancois *et al.*, 1994). Angelockt durch ebenfalls von IEC sezernierte, chemotaktisch wirksames IL-8 dringen die IEL in die epitheliale Zellschicht ein (Ebert, 1995). Die Bindungen zwischen den $\alpha_E\beta_7$ -Integrin- und den E-Cadherin-Liganden ermöglichen es den IEL dort ihre Effektorfunktionen wahrzunehmen.

In der Lamina propria und dem Epithel des Darms existieren neben den klassischen T-Zellpopulationen einige weitere ungewöhnliche Subpopulationen von T-Zellen, die sich aufgrund ihrer molekularen und funktionellen Eigenschaften von T-Zellen mit einem systemischen Charakter unterscheiden (Köhne *et al.*, 1999). Tab. 1-3 fasst die phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu peripheren Blutlymphozyten (PBL) zusammen. Auffällig ist, dass sowohl der Anteil an aktivierten CD25-exprimierenden T-Zellen als auch der von CD45R0-exprimierenden Gedächtniszellen in den LPL und IEL gegenüber PBL außergewöhnlich hoch ist (Ullrich *et al.*, 1990; Ebert, 1993). Andererseits zeigen sich bei einer konventionellen Stimulation solcher Lymphozyten zumeist niedrigere Proliferationsraten als für PBL. Diese Unterschiede weisen auf eine besondere Rolle dieser T-Zellpopulationen hin.

1.3.2.3.1 Lamina propria-Lymphozyten

Die mukosalen Lymphozyten, die diffus in der Lamina propria verteilt sind, werden als LPL bezeichnet. LPL weisen ein ähnliches T-Zell-Rezeptor-Repertoire wie PBL auf und befinden sich in zumeist einem aktivierten Zustand. Die überwiegende Expression von CD45R0 weist auf den Gedächtnischarakter der Lymphozyten hin (Agace *et al.*, 2000), die meisten der in der Lamina propria befindlichen Lymphozyten haben also einen Antigenkontakt in den induktiven Organen des Darms erfahren. Trotzdem reagieren solche LPL in Experimenten auf eine Stimulation mit CD3-Antikörpern nur mit einer im Vergleich zu PBL schwachen Proliferation (Pirzer *et al.*, 1990). Möglicherweise weist dies auf die besondere Immunsituation im Darm hin, eine Überreaktion gegenüber harmlosen Antigenen wird durch die Sekretion antiinflammatorischer und regulatorischer Zytokine verhindert (Quiao *et al.*, 1993). Eine weitere Funktion der LPL-T-Zellen ist die Kontrolle der Produktion von IgA-Antikörpern (Hornquist *et al.*, 1997). Damit LPL-B-Lymphozyten große Mengen an IgA-Antikörpern sezernieren, benötigen sie die T-Zellhilfe der aktivierten T_H2-Zellen, die ihnen diese durch ihren Rezeptor CD40L zur Verfügung stellen (Fuleihan *et al.*, 1993; Banchereau *et al.*, 1994).

1.3.2.3.2 Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)

IEL wandern in den basolateralen Bereich des intestinalen Epithels ein und stellen die vorderste Abwehrlinie im intestinalen Immunsystem dar. Sie exprimieren zu ca. 70% CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere auf ihrer Oberfläche (Jarry *et al.*, 1990) und verfügen in der

Regel über ein cytolytisches Potential (Davies und Parrott, 1980). Weitere Populationen von IEL erweisen sich als doppel-positiv (>10%) oder doppelt-negativ (10%) für die Korezeptoren CD4 und CD8. Darüber hinaus liegt der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen bei den IEL mit ca. 50% weit über dem Anteil, den T-Zellen im Blutkreislauf oder auch im LPL-Kompartiment aufweisen (Lefrancois, 1991).

Die Funktionen dieser einzelnen T-Zellpopulationen werden zurzeit nicht verstanden, jedoch reagieren diese nicht im klassischen Sinne auf ihr spezifisches Antigen im MHC-Restriktionselement (Hayday *et al.*, 2002). Bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kommt diesen T-Zellpopulationen möglicherweise eine besondere Bedeutung bei der Initiation und Chronizität der Erkrankung zu (Romagnani *et al.*, 1997). Die Variation der verwendeten und exprimierten $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TCR ist im Vergleich zu systemischen T-Zellen sehr gering (Ullrich *et al.*, 1990; Helgeland *et al.*, 1999), die IEL-Populationen verfügen somit nur über ein eingeschränktes Repertoire autoreaktiver TCR.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auf der Oberfläche von Enterozyten nicht-klassische MHC-I-ähnliche Präsentationsmoleküle (CD1) exprimiert werden (Bleicher *et al.*, 1992). CD1-Moleküle dienen hauptsächlich der Präsentation bakterieller Lipide und Glykolipide (Beckman *et al.*, 1994). Solch eine Rückentwicklung des adaptiven Immunsystems zu einer weitaus eingeschränkteren Erkennung konservierter Erkennungsmotive könnte dazu dienen, den Beginn einer Infektion oder einer intestinalen Schädigung im Epithel anhand konservierter Motive, beispielweise LPS, festzustellen (Boismenu und Havran, 1997).

1.3.2.3.3 Myeloide Effektorzellen der Lamina propria

Neben den spezifischen Lymphozyten ist auch eine Reihe myeloider Leukozyten an der Immunabwehr in der Lamina propria beteiligt und üben dort ihre Effektorfunktionen aus.

Makrophagen steigern ihre Fähigkeit zur Phagozytose und zur Abtötung von Mikroorganismen in Anwesenheit von IFN- γ bzw. während einer Entzündung (Johnston *et al.*, 1993). Sie sezernieren auch sekretorische Produkte, die unspezifisch gegen pathogene Erreger wirken. Komplementfaktoren dienen der Opsonisierung von Bakterien, Sauerstoffmetabolite schädigen durch ihre Radikalbildung die eindringenden Erreger, und antibakteriell wirksame Defensine und Enzyme, wie beispielweise das

Lysozym, töten Bakterien ab. Makrophagen sind auch für die Freisetzung von entzündlichen Mediatoren, wie zum Beispiel Prostaglandinen, Zytokinen (TNF- α , IL-12, IL-10) und Chemokinen (IL-8, MIP-1 α/β) verantwortlich (Stumbles *et al.*, 1999).

Aktivierte eosinophile Granulozyten sezernieren mit Hilfe ihrer Granulae vornehmlich neurotoxische Proteine. Eine Freisetzung dieser neurotoxischen Proteine, wie MBP (Major Basic Protein), ECP (Eosinophil Cationic Protein) und EDN (Eosinophil-derived Neurotoxin) schädigt umliegendes Gewebe großflächig, insbesondere Epithelzellen scheinen von dieser Wirkung betroffen zu werden. Zusätzlich stimulieren die freigesetzten Neurotoxine auch die Histaminproduktion von Mastzellen.

Mastzellen sind meist in der Nähe von Blutgefäßen und enterischen Nerven lokalisiert (Lin und Befus, 1999). Eine Aktivierung von Mastzellen führt zur Freisetzung großer Mengen Histamin. Das von Nervenzellen produzierte Neuropeptid Substance P (Befus *et al.*, 1999) löst beispielweise eine Aktivierung von Mastzellen aus. Histamin erweitert die lokalen Blutgefäße und erhöht die Durchlässigkeit des Endothels, so dass zusätzliche Leukozyten ins Gewebe eindringen können.

1.3.2.4 Orale Toleranz

Das primäre Organ zur Induktion von Toleranz stellt der Thymus dar. Hier werden autoreaktive T-Zellen negativ selektiert, durch Apoptose sterben diese T-Zellen ab (Kisielow *et al.*, 1988; Boehmer *et al.*, 2003). Jedoch entgehen häufig potentiell autoaggressive T-Zellen der zentralen Toleranz. „Orale Toleranz⁵“ lässt sich als ein Phänomen definieren, in dem eine immunologische Reaktion gegen ein oral verabreichtes Antigen unterbleibt. Dieser Zustand wird allgemein als „Hypo-“ bzw. „Unresponsiveness“ bezeichnet. Die Ausbildung einer oralen Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen und intestinaler Mikroflora stellt die überaus bedeutsame Fähigkeit des mukosalen Immunsystems dar, sich trotz einer Fülle im Darm existierender Antigene auf immunologisch bedeutsame Antigene bzw. Pathogene zu konzentrieren (Weiner *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist die „orale Toleranz“ ein Schutzmechanismus gegen Autoimmunreaktionen gegen Selbstantigene und beugt Autoimmunerkrankungen vor. Eine funktionierende „orale Toleranz“ verhindert, dass entlang der mukosalen Oberflächen fortwährend inflammatorische Prozesse initiiert werden, die zur Zerstörung

des Gewebes führen würden. Hingegen führt das Eindringen eines pathogenen Erregers durch das Auslösen bestimmter Gefahrensignale zu seiner Illumination im Organismus (Matzinger, 1994). Der pathogene Erreger wird aufgrund dieser „Danger Signals“ als solcher erkannt, und es wird eine entsprechende Immunantwort gegen den Erreger eingeleitet.

Orale Toleranz wird durch zwei unterschiedliche zelluläre Mechanismen vermittelt, zum einen durch die Induktion regulatorischer T-Zellen (Bruce und Ferguson, 1986), zum anderen durch die Anergie von T_H1- bzw. T_H2-Zellen (Whitacre *et al.*, 1991), die im Extremfall auch zur peripheren Deletion von spezifischen T-Zellen führen kann (Marth *et al.*, 1996).

Entscheidend dafür, welcher dieser beiden Mechanismen ausgelöst wird, ist die Dosis des verabreichten Antigens (Friedman *et al.*, 1994). Niedrige Dosen des verabreichten Antigens führen zur Induktion regulatorischer T-Zellen, die bei Erkennung ihres spezifischen Antigens TGF- β produzieren und als Beiständerzellen unspezifisch Immunantworten supprimieren (Miller *et al.*, 1991). Hingegen führen hohe Dosen zur Anergie der betreffenden Zellen (Melamed und Friedman, 1993), in selteneren Fällen auch zur klonalen Deletion der T-Zellen. Regulatorische T-Zellen werden auch als „infektiöse Toleranz“ bezeichnet, da mittels eines Transfers die Toleranz gegen ein spezifisches Antigen in ein anderes Individuum übertragen werden kann (Mowat *et al.*, 1987).

1.4 Mausmodelle für CEDE

Eine Vielzahl verschiedener Mausmodelle ist etabliert worden, um die Mechanismen des gastrointestinalen Immunsystems zu untersuchen und die Ätiologie der CEDE zu klären (s. Tab. 1-4). Diese Modelle münden in gemeinsamen Entzündungsprozessen, entweder in T_H1- oder in T_H2-vermittelte Immunantworten, in denen entweder gesteigerte Mengen an IL-12, TNF- α und IFN- γ oder an IL-4 und IL-5 freigesetzt werden (Strober *et al.*, 1998a).

Letztlich entscheidet die eingeleitete T-Zellantwort über das histopathologische Erscheinungsbild der Erkrankung, T_H1-Modelle weisen transmurale zelluläre Infiltrate

⁵ Aus historischen Gründen wurde in der Literatur an dem Begriff „Orale Toleranz“ festgehalten. Die erste zu diesem Thema erschienene Publikation berichtet von Eingeborenen, die zur Prävention Gifffeu (*Toxicodendron radicans*) oral in geringen Mengen zu sich nehmen, um sich gegen eine Vergiftung zu schützen (Dakin, 1829).

mit Granulombildungen auf (MC-Charakter), während T_H2 -Modelle eher zu oberflächlichen zellulären Infiltraten im Bereich des Epithels neigen (CU-Charakter) (Fuss *et al.*, 1996).

Tab. 1-4: Mausmodelle der CEDE

Tab. 1-4 teilt die verschiedenen Mausmodelle in unterschiedliche Kategorien ein. Genetisch modifiziert wurden die defizienten „Knockout“-Mäuse ($^{-/-}$), die transgenen (tg) und die Antigen-spezifischen Mausmodelle. In die Kategorie „Irritantien“ sind diejenigen Mausmodelle eingeordnet, bei denen zur Initiation einer Kolitis chemische Irritantien verwendet werden. Von beiden Kategorien hebt sich der Transfer von T-Zellen in SCID-Mäusen ab.

Mausmodell			Immunantwort
Genetische Modifikation	Transgen	Δ NCAD-tg Chimären TNF Δ ARE-tg STAT4-tg T-bet-tg Δ TGF- β RII	Intestinale Barriere, T_H1/T_H2 -Antwort T_H1 -Antwort T_H1 -Antwort T_H1 -Antwort defiziente Regulation, T_H1 -Antwort
	Knockout	IL-2 $^{-/-}$ TCR- α $^{-/-}$ IL-10 $^{-/-}$	T_H1 -Antwort T_H2 -Antwort defiziente Regulation, T_H1 -Antwort
	Antigen	GFAP-HA x CL4-TCR-tg OT-1 Transfer in IFABP-Ova-tg	T_H1 -Antwort T_H1 -Antwort
Irritantien		Dextran-Natriumsulfat (DSS) Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) Oxazalon-Kolitis	T_H1 -Antwort T_H1 -Antwort T_H2 -Antwort
		CD4 $^{+}$ CD45RB lo T-Zelltransfer in SCID-Mäuse	regulatorische Funktion von CD4 $^{+}$ CD45RB lo T-Zellen

In einer überragenden Mehrzahl der bestehenden Maussysteme leiten sich diese entzündlichen Prozesse entweder von dysregulierten Effektorfunktionen oder von veränderten regulatorischen Prozessen ab. Die in Tab. 1-4 aufgelisteten Modelle führen in der Regel zur Induktion einer T_H1 - und nur selten zu einer T_H2 -Antwort (Strober *et al.*, 2002). Für dieses Ungleichgewicht ist möglicherweise das Vorhandensein von Mitogenen wie LPS, CpG-Motiven und Superantigenen in Bakterien der Darmflora verantwortlich zu machen. Die Bindung dieser Mitogene an Lymphozyten führt vornehmlich zur Induktion einer durch IL-12 betriebenen T_H1 -Immunantwort. Außerdem scheinen die regulatorisch wirksamen Zytokine TGF- β und IL-10 vornehmlich T_H1 -Antworten zu inhibieren. So konnte gezeigt werden, dass zur Suppression einer T_H2 -Immunantwort weitaus größere Mengen an TGF- β als zur Suppression einer T_H1 -Antwort vorhanden sein müssen (Ludviksson *et al.*, 2000). Mit Sicherheit ist auch die Natur des auslösenden Antigens von Bedeutung. Möglicherweise

diktiert die Beschaffenheit eines Antigens dem Organismus eine bestimmte Immunantwort. So löst TNBS T_H1 -Antwort in SJL/J-Mäusen aus, Oxazalon hingegen eine eher untypische T_H2 -Antwort (Boirivant *et al.*, 1998).

1.4.1 T_H1 -Modelle

In einer Reihe von Modellen kommt es aufgrund einer Überproduktion von entzündlichen Zytokinen, wie z. B. IFN- γ , TNF- α und IL-12, zu einer T_H1 -vermittelten Entzündung, die zu veränderten Effektorfunktionen führt. Histologische Analysen zeigen, dass sich die in diesen Systemen ausgelösten Pathogenesen einander ähneln. Eines der am besten untersuchten Beispiele hierfür ist die TNBS-induzierte Kolitis in SJL/J-Mäusen. Von diesem Mausstamm ist bekannt, dass er eine starke genetisch prädisponierte Neigung zu T_H1 -Immunantworten aufweist; dieses Modellsystem soll im Kap. 1.4.1.1 gesondert betrachtet werden.

Weitere Beispiele für T_H1 -vermittelte Entzündungen aufgrund veränderter Effektorfunktionen sind STAT4- und T-bet-transgene Mäuse. Bei ihnen kommt es durch Dysregulation ihrer Transkriptionsfaktoren STAT-4 und T-bet zu einer Überproduktion von IFN- γ , wodurch eine T_H1 -vermittelte Immunantwort in den entsprechenden T-Zellen vorprogrammiert wird (Wirtz *et al.*, 1999a; Szabo *et al.*, 2000). Neue Studien haben gezeigt, dass T-bet und nicht STAT-4 der entscheidende Transkriptionsfaktor ist, der bei entsprechender Signaltransduktion eine T_H1 -Differenzierung einschaltet (Mullen *et al.*, 2001).

In TNF- Δ -ARE-Mäusen wird die Überproduktion von TNF- α durch eine Deletion einer AU-reichen regulatorischen Domäne innerhalb der untranslatierten 3'-Region des TNF- α -Gens und anschließender Dysregulation erreicht (Kontoyiannis *et al.*, 1999). Der Genotyp dieser Mäuse führt zu schwerwiegenden Entzündungen im terminalen Ileum. Der Entzündungsprozess ist durch transmurale infiltrative Läsionen und Granulome gekennzeichnet und weist große Ähnlichkeiten zum MC auf.

Neben Maussystemen, in denen T_H1 -vermittelte Entzündungen durch die Überexpression von inflammatorischen Zytokinen induziert werden, existieren auch Modelle, in denen es aufgrund von Defekten in ihren regulatorischen Funktionen zur Initiation von T_H1 -vermittelten Entzündungsprozessen kommt. Hier sollen das Modell der IL-10-defizienten Knockout-Mäuse und der Transfer von regulatorischen $CD4^+$ $CD45RB^{hi}$ -T-Zellen in SCID-Mäuse aufgrund ihrer Bedeutung für die CEDE-Forschung gesondert betrachtet werden (s. Kap. 1.4.1.2 und Kap. 1.4.1.3).

Ein weiteres Beispiel für einen Defekt in der Regulation von T-Zellen ist die dominant-negative TGF- β -RezeptorII-transgene Maus. Unter einem CD4-Promotor führt die Expression dieser defekten TGF- β RII Kette zu einem Abbruch des TGF- β -Signaltransduktionsweges in den Effektor-T-Zellen (Lucas *et al.*, 2000; Gorelik und Flavell, 2000). In diesem Modell können die regulatorischen T-Zellen ihre Funktion nicht ausüben, da die Ziel-Effektorzellen nicht auf das sezernierte TGF- β reagieren. Im Gegensatz zur IL-10-defizienten Maus war es aber nicht möglich direkt in TGF- β -defizienten Mäusen CEDE zu untersuchen, eine solche Defizienz führte zu einer multiorganischen Entzündung und erwies sich für die Mäuse im Verlauf ihrer Ontogenese als letal (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993).

Das CEDE-Modell der IL-2^{-/-} defizienten Maus wurde zufällig entdeckt. IL-2 ist als zentraler Wachstumsfaktor des Immunsystems bekannt, der seine Wirkung auf sehr viele verschiedene Immunzellen ausübt (Abbas *et al.*, 1994). IL-2-defiziente Tiere zeigen eine gesteigerte Aktivierung des Immunsystems, die sich in einer starken Vergrößerung und Entzündung der sekundären Lymphorgane (Lymphknoten; Milz) manifestiert und bei vielen Tieren zum Tode führt. Nur in den überlebenden Tieren kann sich im weiteren Verlauf eine T-zell-abhängige Kolitis vom T_H1-Typ entwickeln (Ma *et al.*, 1995). Während in diesem Modell das Muster der beteiligten Zytokine einer T_H1-vermittelten Immunantwort und somit MC entspricht, deutet die Lokalisation und Histologie der Entzündung eher auf eine CU hin (Sadlack *et al.*, 1993). Mit Hilfe von IL-2^{-/-} x β 2M^{-/-}-(β 2-Mikroglobulin)-doppeltdefizienten Mäusen wurde gezeigt, dass die Entstehung der Kolitis von der Anwesenheit von CD4⁺ T-Helfer-Zellen abhängt (Simpson *et al.*, 1995).

1.4.1.1 TNBS-induziertes Kolitis-Modell

In diesem Modell führt die rektale Applikation von TNBS (Trinitrobenzol-Sulfonsäure) in Gegenwart von Ethanol zur transmuralen infiltrativen T_H1-vermittelten Entzündung, die sich auf das Kolon beschränkt (Neurath *et al.*, 1995).

Der Entzündungsprozess in diesen Mäusen basiert auf einer heftigen Sezernierung von IL-12. Eine einmalige Behandlung mit α -IL-12-Antikörpern kann den Entzündungsprozess präventiv verhindern oder ihn auch nach dem Ausbruch der Erkrankung zum Erliegen bringen (Neurath *et al.*, 1995). Für den schnellen Behandlungserfolg bei der Applikation von α -IL-12-Antikörpern ist offenbar eine

Apoptose der für die Auslösung der Kolitis verantwortlichen T_H1-Zellen verantwortlich (Fuss *et al.*, 1999).

Die Hapten-induzierte TNBS-Kolitis in SJL/J-Mäusen stellt ein wichtiges Modell zur Untersuchung von CEDE dar, da es eine Untersuchung der initialen Ereignisse ermöglicht, die zur Entwicklung einer Kolitis führen. Des weiteren ist es in diesem Modell möglich, die Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen (Hapten) zu studieren, die dann im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer übergreifenden chronischen Entzündung gegen diverse mukosale Antigene führt (Duchmann *et al.*, 1996).

Mit diesem Modell lässt sich die protektive Wirksamkeit oraler Toleranz belegen. Nach oraler Applikation von TNBS kann eine anschließende rektale Applikation keine Kolitis mehr auslösen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die orale Applikation von TNBS zur Induktion regulatorischer TGF- β -produzierender Zellen in der Lamina propria führt, die eine T_H1-Antwort verhindern (Neurath *et al.*, 1996; Elson *et al.*, 1996).

In diesem Modell übernimmt das Zytokin TGF- β die entscheidende regulatorische Funktion bei der Prävention einer Kolitis. Durch die orale Applikation von TNBS werden neben den TGF- β -sezernierenden Zellen auch IL-10-sezernierende Zellen induziert, diese scheinen den präventiven Schutz gegen die Kolitis zu verbessern, nehmen aber nur eine unterstützende Funktion ein (Fuss *et al.*, 2002). Die TNBS-induzierte Kolitis in SJL/J-Mäusen beruht also auf der schnellen Initiation einer durch IL-12 vermittelten T_H1-Antwort, die einer regulatorischen Immunantwort in Form von TGF- β -sezernierenden Zellen zuvorkommt.

1.4.1.2 SCID-Transfer-Modell

In diesem Modell werden SCID (Severe Combined Immunodeficiency)-Mäuse, welche über keine funktionsfähigen Lymphozyten verfügen, entweder mit einer reinen naiven T-Zellpopulation (CD4⁺ CD45RB^{hi}) oder aber einer naiven T-Zellpopulation zusammen mit einer Gedächtnispopulation von T-Zellen (CD4⁺ CD45RB^{lo}) transferiert. Im Falle eines Transfers von CD4⁺ CD45RB^{hi}-Zellen entwickelt sich in den SCID-Mäusen nach ca. 3 bis 5 Wochen eine Kolitis, die sich ausschließlich im Kolon manifestiert (Morissey *et al.*, 1993; Powrie *et al.*, 1993). Ein Kotransfer von CD4⁺ CD45RB^{lo}-T-Zellen mit den naiven CD4⁺ CD45RB^{hi}-Effektor-T-Zellen verhindert hingegen den Ausbruch der Erkrankung. Später wurde gezeigt, dass CD25-positive T-Zellen innerhalb der CD4⁺ CD45RB^{lo}-Zellpopulation für die Unterdrückung der Kolitis beim Transfer in die SCID-

Mäuse verantwortlich sind (Read *et al.*, 2000). Das SCID-Transfer-Modell erlaubt die getrennte Untersuchung von Regulator- und Effektor-Zellen, was eine Analyse des Zusammenspiels zwischen beiden Zellpopulationen ermöglicht.

Die Immunantwort in diesem Mausmodell ist ebenfalls von IL-12 abhängig und führt zur Freisetzung großer Mengen an IFN- γ (Powrie *et al.*, 1994). Da sich die Entzündungsprozesse auf das Kolon beschränkten und diese in keimfreien Mäusen weniger stark ausgeprägt waren, führte dies zu der Annahme, dass endogene Bakterien des Kolons den antigenen Stimulus für die mukosale Entzündung in diesem Modell darstellen. Es wurde auch gezeigt, dass aus Kolitis-Mäusen stammende CD4⁺ T-Zellen auf fekale Extrakte aus normalen, nicht aber aus keimfreien Mäusen, proliferierten und mit der Produktion von T_H1-Zytokinen antworteten (Aranda *et al.*, 1997). Die Aktivierung der transferierten Zellen im SCID-Modell ist somit auf eine unangemessene Immunantwort gegen ein luminales Antigen zurückzuführen.

Der protektive Effekt der CD45RB^{lo}-Population lässt sich in diesem Modell gleichermaßen auf die Sekretion von TGF- β und IL-10 zurückführen. Die Bedeutung von TGF- β wurde durch α -TGF- β -Antikörper belegt, deren Applikation führt auch beim Transfer einer regulatorischen CD4⁺ CD45RB^{lo}-Population zur Auslösung einer Entzündung (Read *et al.*, 2000). Auch *in-vitro* führt eine Aktivierung der CD4⁺ CD45RB^{lo}-Population über α -CD3- und α -CTLA-4-Antikörper zur Produktion von TGF- β . Die Freisetzung von TGF- β ist dabei strikt von der Ligation des inhibitorisch wirksamen CTLA-4-Rezeptors auf der Oberfläche der CD4⁺ CD45RB^{lo}-T-Zellen abhängig (Nakamura *et al.*, 2001).

Die Bedeutung von IL-10 bei der Suppression einer Entzündung wurde mit IL-10-transgenen Mäusen belegt. Naive CD4⁺ CD45RB^{hi}-Zellen aus IL-10-transgenen Mäusen waren nicht in der Lage eine Kolitis in SCID-Mäusen auszulösen (Hagenbaugh *et al.*, 1997). Außerdem gelang es durch die Zugabe von IL-10 T-Zellklone *in-vitro* zu expandieren, die in großem Maße IL-10 und in einigen Fällen auch TGF- β produzierten. Diese Zellen verhindern ebenso wie CD4⁺ CD45RB^{lo}-T-Zellen während eines Kotransfers mit CD4⁺ CD45RB^{hi}-T-Zellen Entzündungen in SCID-Mäusen (Groux *et al.*, 1997). Diese *in-vitro* generierten T-Zellen werden T_R1-Zellen genannt, da sie im Gegensatz zu T_H3-Zellen die Immunsuppression hauptsächlich über IL-10 bewerkstelligen (s. Kap. 1.3.2.2.3).

Als Fazit zeigt sich im SCID-Modell, dass sowohl TGF- β als auch IL-10 wesentliche Funktionen in der Suppression einer zellulär transferierten Kolitis übernehmen. Es bleibt aber ungeklärt, wie die beiden Zytokine zusammenwirken, um ihre regulatorischen Effekte zu entfalten.

1.4.1.3 IL-10-defizientes Kolitis-Modell

IL-10-defiziente Mäuse bzw. Mäuse mit defekter IL-10-Signaltransduktion entwickeln unter SPF-(Specific Pathogen Free)-Bedingungen eine Kolitis, die sich vom Duodenum bis zum Rektum erstrecken kann und durch epitheliale Hyperplasie und eine transmurale Entzündung gekennzeichnet ist (Kühn *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 1998).

In diesem Modell ist die fehlende Suppression einer entzündlichen Immunantwort für die Entstehung einer Kolitis verantwortlich. Die Hauptfunktion des Zytokins IL-10 ist die negative Regulation bzw. Suppression von T_H1-Antworten. In der IL-10-defizienten Maus kann dieses aber nicht von regulatorischen T-Zellen sezerniert werden, eine T_H1-vermittelte Entzündung kann somit nicht unterdrückt werden und ein andauernder Antigenkontakt führt zur Entzündung (Fiorentino *et al.*, 1991; Groux *et al.*, 1996).

Die Erkrankung bricht nicht unter keimfreien Bedingungen aus und ist von der Anwesenheit mukosaler Antigene abhängig (Dieleman *et al.*, 1998). Eine neuere Studie vermutet, dass die Herabsetzung der Barrierewirkung des Epithels das initiale Moment für die Pathogenese der Kolitis ist. Offenbar führt der erhöhte Transport luminaler Antigene in die Lamina propria zu vermehrten Kontakten und erhöhter Stimulation der Lymphozyten und initiiert dadurch die entzündlichen Prozesse im Darmepithel (Madsen *et al.*, 1999).

Die Pathogenese der Kolitis in IL-10-defizienten Mäusen wird durch T_H1-Zellen vermittelt, der Ausbruch der Erkrankung kann durch eine Behandlung mit α -IL-12-Antikörpern verhindert werden (Kullberg *et al.*, 1998). Hingegen waren α -IFN- γ - und α -TNF- α -Antikörper nicht in der Lage, eine Kolitis zu verhindern. Somit können diese Zytokine keine zentrale Rolle bei der Entstehung der Kolitis in den IL-10-defizienten Mäusen spielen (Kullberg *et al.*, 2001).

Auch in diesem Modell stellt sich wiederum die Frage nach Bedeutung und Stellung der immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- β . Wahrscheinlich führt nicht die Defizienz von IL-10 in IL-10^{-/-}-defizienten Mäusen zu einer Kolitis, sondern das Ausbleiben einer adäquaten TGF- β -Antwort als Folge der Abwesenheit von IL-10. Strober *et al.* vermuten im Kontext der in diesem Kapitel genannten Indizien, dass es

sich beim TGF- β um das eigentlich wirksame regulatorische Zytokin handelt, während IL-10 eine nur unterstützende Funktionen bei der Immunsuppression übernimmt (Strober *et al.*, 2002).

1.4.2 T_H2-Modelle

Die Anzahl der bestehenden Modelle für eine T_H2-vermittelte Entzündung ist sehr begrenzt (s. Tab. 1-4). Das wichtigste Modellsystem ist hier die Kolitis in TCR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, ein weiteres Modell ist die Oxazalon-induzierte Kolitis, deren Verlauf aber eher einer akuten Kolitis entspricht.

1.4.2.1 TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizientes Kolitis-Modell

In TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen entwickelt sich eine T_H2-vermittelte chronische Kolitis (Mombaerts *et al.*, 1992), die der Colitis ulcerosa im Menschen ähnelt. Die Kolitis in TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen ist durch eine oberflächliche Entzündung des Epithels, verlängerte und veränderte Kryptenstrukturen sowie durch Abzessbildung in Kryptennähe gekennzeichnet (Dohi *et al.*, 2003). Im Blut von TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen lassen sich Autoantikörper gegen Neutrophile isolieren (Mizoguchi *et al.*, 1996). Im Vergleich zu einer T_H1-vermittelten Kolitis basiert der Entzündungsprozess in TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen nicht auf IL-12, sondern auf IL-4 (Takashi *et al.*, 1997). Die Mehrzahl der sich in TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen entwickelnden Lymphozyten sind $\gamma\delta$ -Lymphozyten, allerdings wird die Kolitis durch eine kleinere Population von $\beta\beta$ -T-Zellen ausgelöst, deren T-Zellrezeptor aus einem Homodimer von TCR- β -Ketten besteht (Mizoguchi *et al.*, 1997). Die $\beta\beta$ -T-Lymphozyten verfügen nach der Initiation der Kolitis über ein nur eingeschränktes T-Zellrezeptor-Repertoire, in erkrankten Mäusen lassen sich vornehmlich V β 8.2-Gene nachweisen. Zusätzlich weisen diese T-Zellen auch noch konservierte Aminosäuresequenzen in der Variabilitäts-bestimmenden CDR3-Region auf, was auf einen oligoklonalen Charakter schließen lässt (Mizoguchi *et al.*, 2000). Folglich entsteht die Mehrzahl der $\beta\beta$ -T-Zellen erst während des Entzündungsprozesses aus wenigen T-Zellen, die unkontrolliert expandieren.

Auch in diesem Modell ist die physiologische Darmflora die Basis für die Pathogenese einer chronischen Kolitis, dies konnte in Stimulationsversuchen von $\beta\beta$ -T-Zellen mit mukosalen Antigenen belegt werden (Takahashi *et al.*, 1999). Die Stimulation von $\beta\beta$ -T-Zellen führt zu ihrer Proliferation, Expansion und zur Sezernierung von IL-4. T-

Zellkontakte und Freisetzung von IL-4 stimulieren wiederum B-Zellen und Antikörpersekretion, die Gesamtheit dieser Prozesse perpetuiert im weiteren Verlauf zu einer chronischen Kolitis in TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen. Vermutlich fehlen in diesem System auch regulatorische T-Zellen, die den Entzündungsprozess eingrenzen, da diese sich in TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen aufgrund ihres $\alpha\beta$ -Heterodimer-T-Zellrezeptors nicht entwickeln können.

Unklar bleibt, warum sich in diesem Mausmodell eine T_H2 -Antwort manifestiert. Möglicherweise entwickelt sich in $\beta\beta$ -Homodimer-T-Zellen bevorzugt ein T_H2 -Phänotyp. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse gestützt, in denen $\beta\beta$ -T-Zellen aus TCR- $\alpha^{-/-}$ -defizienten Mäusen isoliert wurden. Wurden die Zellen *in-vitro* unter T_H2 -Bedingungen gehalten, wiesen sie eine höhere Überlebensrate als unter T_H1 -Bedingungen gezogene auf und waren außerdem in der Lage, die Erkrankung auf gesunde Tiere zu übertragen (Mizoguchi *et al.*, 2000).

1.4.3 Mausmodelle mit Barriere-Defekten

1.4.3.1 DSS-induziertes Kolitis-Modell

Ein sehr altes Modell stellt das DSS-(Dextran-Sulfate-Natrium)-Modell durch Applikation über das Trinkwasser dar. Hier wird durch ein chemisches Polysaccharid die Barriereintegrität des Darmes herabgesetzt (Ohkusa, 1985). Schon vor dem Einsetzen der Entzündung kann eine Zunahme der Permeabilität der Darmwand mit Hilfe von Evans Blue gemessen werden (Kitajima *et al.*, 1999). In der akuten Phase wird die DSS-Kolitis durch T_H1 -abhängige Zytokine vermittelt, im weiteren chronischen Verlauf gewinnen aber auch T_H2 -vermittelte Prozesse an Bedeutung (Dielemann *et al.*, 1998).

Auch in Rag-2 $^{-/-}$ -Mäusen kann durch Applikation von DSS eine ähnliche Kolitis wie in Rag-2-positiven Mäusen ausgelöst werden. Dies weist auf eine Aktivierung unspezifischer Zellen hin, insbesondere Makrophagen sezernieren in diesem Modell proinflammatorische Mediatoren, die zur Kolitis führen (Egger *et al.*, 2000).

1.4.3.2 Δ NCAD-transgenes Chimären-Modell

Cadherine sind membranständige Glykoproteine, die Adhärenzkontakte zwischen intestinalen Epithelzellen vermitteln. Auf der Zelloberfläche reagieren sie mit den Cadherinen benachbarter Zellen (Ranscht, 1994). Im dominant-negativen N-Cadherin-

Modell wurden Stammzellen durch „gene-targeting“ so verändert, dass sie ein defektes N-Cadherin unter der Kontrolle eines in Epithelzellen aktiven IFABP-(Intestinal Fatty Acid Binding Promotor)-Promotors exprimieren. Dazu wurde dem N-Cadherin die zur Bindung benachbarter Cadherine unabdingbare extrazelluläre Domäne deletiert (Δ NCAD). Diese Stammzellen wurden dann Blastozyten injiziert, so dass chimäre Mäuse entstanden, in denen bestimmte Bereiche des Dünndarms eine fehlerhafte, andere Bereiche eine gewöhnliche Expression des N-Cadherins aufweisen (Hermiston und Gordon, 1995).

In Bereichen, in denen Δ NCAD exprimiert wird, ist die Adhärenz zwischen den Epithelzellen gelockert und die Integrität der intestinalen Barriere verringert. In solchen Bereichen kommt es zu transmuraler zellulärer Infiltration, aber auch zu Kryptenabszessen und Ulzerationen, während Bereiche mit regulärer N-Cadherin-Expression keine Entzündungen aufweisen. Folglich lässt sich das Erscheinungsbild der Entzündung in diesem Modell weder einer T_H1 - noch einer T_H2 -vermittelten Pathogenese zuordnen.

In diesem Modell führt der irreguläre Eintritt von mukosalen Antigenen zu einem erhöhten Kontakt mit den Lymphozyten des Epithels und der Lamina propria, was eine heftige mukosale Entzündungsreaktion nach sich zieht. Dieses Modell deutet an, dass die Stimulation von Lymphozyten durch den irregulären Eintritt von Antigenen nicht durch die Entwicklung regulatorischer T-Zellen in denselben Bereichen aufgefangen werden kann. Vermutlich sind T-Zellen nur in den Peyerschen Plaques und unter den dort vorliegenden Bedingungen in der Lage, zu regulatorischen T-Zellen zu differenzieren.

1.4.4 TCR transgene Mausmodelle

TCR transgene Mausmodelle werden erst seit kurzem zur Untersuchung mukosaler Entzündungsprozesse im Darm eingesetzt. T-Zellen in genetisch modifizierten TCR-transgenen Mauslinien richten sich gegen ein definiertes Peptid, gegen das ihr TCR „konstruiert“ wurde. Gemäss dem immunologischen Kontext der Präsentation führt die Präsentation des spezifischen Peptids auf MHC-Molekülen zur Toleranz oder zur Aktivierung der transgenen T-Zellen. Die Kenntnis über die Beschaffenheit des TCR-Rezeptors und des korrespondierenden Antigens erlaubt die Beobachtung der immunologischen Prozesse, die durch die Erkennung des Antigens ausgelöst werden.

Verschiedene spezifische TCR-transgene Mauslinien wurden gegen diverse Modellantigene generiert, z. B. gegen das H-Y-Antigen männlicher Mäuse (Bluthmann *et al.*, 1988), gegen das Glykoprotein 1 des *LCM-Virus*⁶ (Moskophidis *et al.*, 1992) oder das Ovalbumin-(Ova)-Antigen (Hogquist *et al.*, 1994).

Zur Herstellung von TCR-transgenen Mäusen werden funktionell rearrangierte TCR-Gene in das Genom der Mäuse eingebracht (Uematsu *et al.*, 1988). Die rekombinierten TCR-Gene entstammen einem T-Zell-Hybridom, das eine genau definierte Spezifität gegenüber einem Antigen aufweist. Die TCR-Gene des Hybridoms werden identifiziert, isoliert und befruchteten Oozyten injiziert, die anschließend Ammen zur Austragung implantiert werden. Die Integration von TCR-A- und TCR-B-Genen in das Genom der zu generierenden Mauslinien führt zur Expression eines transgenen $\alpha:\beta$ -TCR auf der Oberfläche der sich entwickelnden T-Zellen, womit gleichzeitig eine Rekombination und Expression endogener TCR-Ketten in diesen Zellen verhindert wird (Bluthmann *et al.*, 1988). Folglich wird in diesen Mäusen eine natürliche Entwicklung des TCR-Repertoires zugunsten der Entwicklung einer homogenen Population von TCR-transgenen T-Zellen unterdrückt. Der Anteil TCR-transgener T-Zellen variiert zwischen den verschiedenen TCR-transgenen Mauslinien. Da es auch in transgenen Mäusen vereinzelt zur Rekombination und Expression endogener TCR-Ketten kommt und die Spezifität des transgenen Rezeptors von der Expression beider transgenen TCR-Ketten abhängt, kann dieser Wert 100% nicht erreichen. Insbesondere im TCR-A-Gen funktioniert die transgenvermittelte Suppression der endogenen Rekombination nur unzureichend (Steinmetz *et al.*, 1989).

Das definierte Antigen übt außerdem eine determinierende Wirkung auf die sich entwickelnden Thymozyten aus, da das Antigen im Stroma des Thymus nur auf MHC-I- oder aber auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden kann. Somit differenzieren sich die doppelt-positiven reaktiven Thymozyten vornehmlich entweder zu CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen oder zu CD4-positiven T_{Helfer}-Zellen. Für den Aufbau des Darm-HA-Modells in dieser Arbeit wurden die TCR-transgenen Mauslinien TCR-HA und CL4-TCR die verwendet (s. Kap. 1.5.3).

⁶ LCMV - engl. **L**ymphocytic **C**horiomeningitis **V**irus

1.4.4.1 OT-1 Transfer-Modell in IFABP-Ovalbumin transgene Mäuse

In diesem Modell wird das Modellantigen Ovalbumin unter dem IFABP-(intestinal fatty acid binding protein)-Promotor im Cytosol von Enterozyten exprimiert (Vezys *et al.*, 2000). Ein Transfer OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (OT-1) führte zur Aktivierung und Expansion der T-Zellen in den mesenterischen Lymphknoten, jedoch zu keiner Gewebeschädigung des intestinalen Epithels. Erst der Transfer von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und die gleichzeitige Infektion mit einem Ovalbumin-exprimierenden vesikulären Stomatitis Virus (VSV-Ova) führte zu einer OT-1-vermittelten Epithelzerstörung. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein induzierter Entzündungszustand notwendig ist, um die Autoreaktivität der OT-1-Zellen gegenüber ihrem Antigen zu aktivieren.

1.4.4.2 GFAP-HA x CL4-TCR doppelt transgenes Mausmodell

Die Kreuzung von Antigen-exprimierenden und TCR-transgenen Mäuse mit passender Antigenspezifität ermöglicht die Untersuchung der Reaktion transgener T-Zellen in einem autoimmunen Kontext, da das Antigen in diesen Modellen ein Selbstantigen darstellt. In dem doppelt-transgenen GFAP-HA x CL4-TCR Modell wurden Mäuse, die das Modellantigen Hemagglutinin (s. Kap. 1.5.1) unter einem Gliazell-spezifischen Promotor exprimieren, mit CL4-TCR transgenen Tieren gekreuzt (Cornet *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass doppelt transgene Mäuse eine letale Pankolitis entwickelten und innerhalb von 10 Tagen nach der Geburt verstarben. Transgene CD8⁺ CL4-TCR T-Zellen waren für die Gewebeerstörungen verantwortlich, diese zerstörten zunächst HA-exprimierende Gliazellen, infiltrierten den Darm und die mesenterischen Lymphknoten und lösten eine T_H1-vermittelte Immunantwort aus. Folglich belegt dieses Modell, dass autoimmune Prozesse an der Auslösung und Chronizität von CEDE beteiligt sein könnten.

1.5 Aufbau des HA-spezifischen Kolitis-Modells

In diesem Kapitel sollen die theoretischen Grundlagen für das verwendete Modellantigen HA, die verwendeten Promotoren und die verwendeten TCR-transgenen Mauslinien erörtert werden. Zur Auslösung einer durch ein spezifisches Antigen vermittelten Kolitis wurde in dieser Arbeit ein doppelt-transgenes Darm-HA x TCR-transgenes Mausmodell etabliert, um die Reaktion HA-(Hemagglutinin)-spezifischer T-

Zellen auf das im Darm exprimierte Hemagglutinin (HA) zu untersuchen. Dazu war es notwendig, das Modellantigen HA spezifisch im Darm zu exprimieren. Diese Mäuse wurden dann mit bestehenden TCR-transgenen Mäusen gekreuzt, oder aber TCR-transgene T-Zellen wurden in die Darm-HA-Mäuse transferiert.

1.5.1 Hemagglutinin als Modellantigen

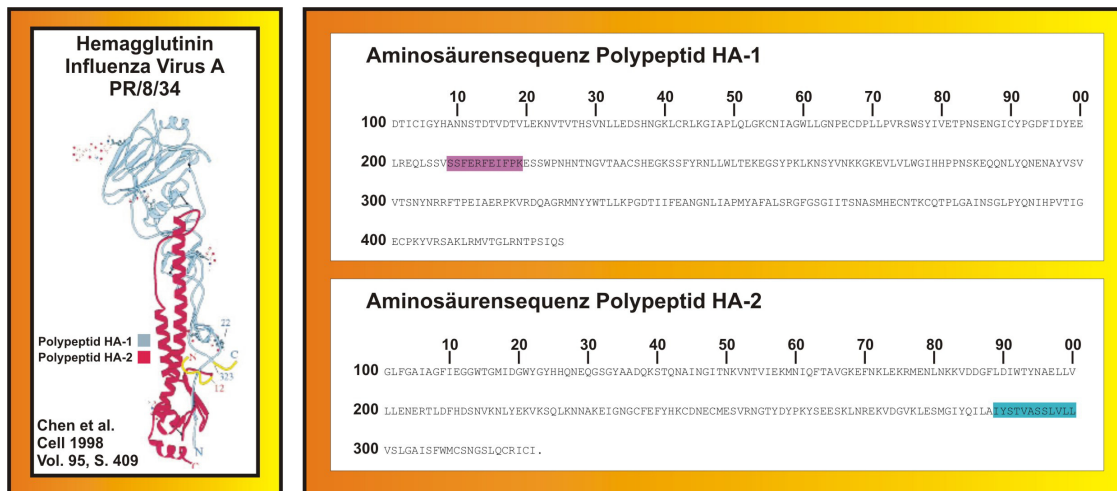


Abb. 1-8: Hemagglutinin Influenza Virus A PR/8/34

Abb. 1-8 zeigt ein monomeres HA-Molekül mit globulärer (lila) und membranständiger Domäne (blau) nach Chen *et al.* (1998). Rechts werden die vollständigen Aminosäuresequenzen angegeben, in denen die beiden von den transgenen T-Zellen erkannten antigenen Determinanten SSFERFEIFPK (rot) und IYSTVASSLVLL (blau) hervorgehoben sind.

Zum Aufbau eines transgenen Mausmodells wurde in dieser Arbeit das virale HA-Protein aus dem Influenza-Virus A⁷ im Darm transgener Mäuse exprimiert. Dieses virale Membranprotein stellt während einer Influenza-Infektion die wesentliche immunogene Zielstruktur dar, die im Wirt zur Auslösung einer effizienten Immunantwort führt (Dowdle *et al.*, 1974; Kilbourne, 1975).

Im Gegensatz zum eher artifiziellen Ovalbumin-Modellantigen (Hogquist *et al.*, 1994) handelt es sich beim HA um ein *in-vivo* relevantes Antigen, das HA-Protein ist deshalb besonders gut als Modellantigen geeignet. Das HA überzeugt durch seine immunogenen Eigenschaften, die in zahlreichen Veröffentlichungen dokumentiert und charakterisiert wurden (Caton *et al.*, 1982). Zudem stehen eine Reihe etablierter „Werkzeuge“ in Form von Primern, Antikörpern, T-Zellklonen und TCR-transgenen Mauslinien zur Analyse der generierten transgenen Mäuse zur Verfügung.

Biochemisch stellt das HA ein Glykoprotein dar, welches von der Wirtszelle als HA-0-Protein translatiert und mittels proteolytischer Spaltung bei einem niedrigen pH-Wert in eine größere aminoternale HA-1- (46kDa) und in eine kleinere carboxyterminale HA-2-Polypeptidkette (27 kDa) gespalten wird, die aber über Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden bleiben. Die HA-1-Polypeptidkette bildet die globuläre Domäne, die HA-2-Polypeptidkette die membranständige Domäne des Glykoproteins (s. Abb. 1-8). Erst durch die Trimerisierung von drei HA-Monomeren bildet sich ein natives HA-Protein (Wiley und Skehel, 1987). Die HA-1-Domäne bildet den „immunogeneren“ Teil des Glykoproteins, da die meisten neutralisierenden Antikörper gegen diese Domäne gerichtet sind (Brand und Skehel, 1972). Allerdings können auch auf dem HA-2-Protein immundominante Epitope bestimmt werden (Kuwano *et al.*, 1989). Die beiden Epitope, welche von den transgenen T-Zellen der TCR-HA- und CL4-TCR Mauslinien erkannt werden und zu deren Aktivierung führen, sind in der Aminosäuresequenz des Hemagglutinins lila bzw. blau unterlegt (s. auch Abb. 1-10).

1.5.2 Darmspezifische Promotoren

Um eine darmspezifische Expression des HA zu erreichen, wurden zur Konstruktion der Transgene drei Promotoren verwendet, deren Aktivität sich nach Kenntnis der Literatur auf den Darm beschränkt. Die verschiedenen Promotoren wurden verwendet, um eine unterschiedliche Abdeckung der Expression im Darm zu ermöglichen. Der Villin-Promotor führt im gesamten Darm zur Expression, während der IFABP-Promotor und der genetisch modifizierte FABPI-(intestinal Fatty-Acid-Binding-Protein)-Promotor ihre Aktivitäten im Dünndarm bzw. im Ileum und im Kolon entfalten (s. Abb. 1-9).

Der ca. 9.0kB große murine Villin-Promotor führt sowohl in unreifen als auch in differenzierten Epithelzellen des Dün- und Dickdarms zu einer effizienten Transgen-Expression. Dieser Promotor hängt in seiner Aktivität von zwei regulatorischen Domänen ab. Die erste regulatorische Domäne befindet in einer 3.5 kB-großen Domäne, die 5'-aufwärts von der Startstelle der Transkription lokalisiert ist. Die zweite ca. 5.5kB große regulatorische Domäne folgt auf das mit 46 bp nur kurze Exon. Neben der Expression im Darm wurde beim Villin-Promotor auch eine schwache Expression des

⁷ Die präzise Bezeichnung des aus dem Virus isolierten Hemagglutinins leitet sich vom Subtypen des Virus sowie vom Ort und vom Zeitpunkt der Isolation ab und lautet vollständig folgendermaßen: Influenza Virus A/ Puerto Rico/ Isolat 8/ 1934 Hemagglutinin (H1-Subtyp) bzw. in Kurzform Influenza Virus A/PR/8/34 (H1).

Transgens im Nierenepithel von Tubuli beobachtet, dabei könnte es sich allerdings auch um einen Effekt der Transgenintegration ins Chromosom handeln (Pinto *et al.*, 1999).

Der aus der Ratte stammende ca. 1.2 kB große IFABP-(intestinal fatty acid binding protein)-Promotor ermöglicht hingegen eine exklusive Expression des HA im gesamten Dünndarm, nicht aber im Kolon. Im proximalen Jejunum wird ein Maximum der Expression erreicht, zum Duodenum und zum Ileum hin sinken die Expressionsniveaus ab. Dabei wird das HA in ausdifferenzierten, aber nicht in unreiferen Epithelzellen der Krypten gebildet (Sweetser *et al.*, 1988; Playford *et al.*, 1996).

Der ca. 0.8kB große genetisch modifizierte FABPi-Promotor stellt das Gegenstück zum IFABP-Promotor aus der Ratte dar und entstammt der Maus (Green *et al.*, 1992). Hier verhindert die Deletion einer regulatorischen Domäne im Promotor (Basen –277 bis –185) die Expression im Duodenum und Jejunum, folglich beschränkt sich hier die Expression auf ausdifferenzierte Epithelzellen des Ileums, aber auch des Kolons (Cohn *et al.*, 1992).

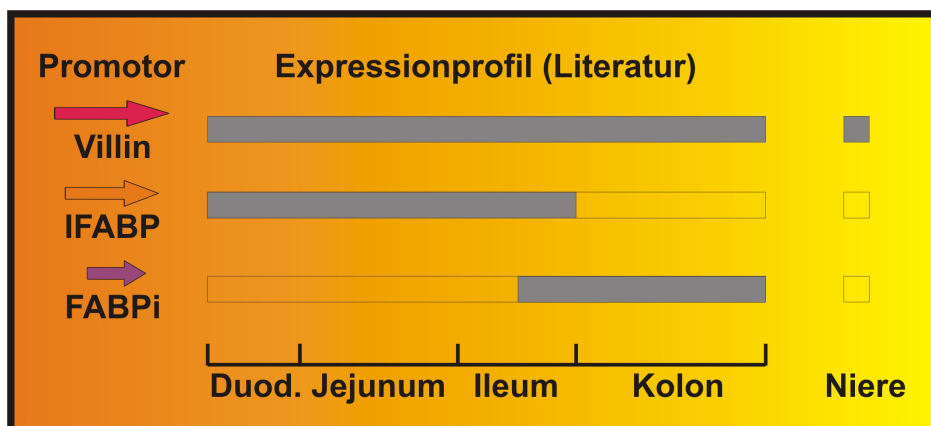


Abb. 1-9: Expressionsprofile der verschiedenen Darm-Promotoren

Abb. 1-9 zeigt das Expressionsprofil der in der Arbeit verwendeten Darmpromotoren vom Duodenum bis zum Kolon. Laut Literatur entfaltet der Villin-Promotor eine schwache Aktivität in der Niere.

1.5.3 HA-spezifische TCR-transgene Mauslinien

Die HA-spezifischen TCR transgenen Mauslinien „TCR-HA“ und „CL4-TCR“ wurden in Rahmen dieser Arbeit verwendet, um das TCR transgene Darm-HA-Modell aufzubauen (s. Abb. 1-10). Beide Mauslinien standen auf einem identischen genetischen Hintergrund (BALB/c) zur Verfügung.

Die TCR-transgene Linie „CL4-TCR“ erkennt das Aminosäurenpeptid IYSTVASSLVLL, welches auf H2-K^d-(MHC-I)-Molekülen präsentiert wird (Morgan *et*

al., 1996). In dieser Mauslinie entwickeln etwa 40% der CD8-positiven T-Zellen einen transgenen $\alpha\beta$ -TCR. Allerdings existiert für den transgenen TCR der CL4-TCR-Linie kein idiotypischer Antikörperklon, weswegen der Nachweis des transgenen TCR zumeist durch Antikörper geführt wird, die sich gegen die V β 8.2- oder die V α 10-Kette des transgenen TCR richten. Erst im Verlauf dieser Arbeit konnten MHC-Tetramere entwickelt werden, welche den transgenen TCR der CL4-TCR Mauslinie erkennen (Altman *et al.*, 1996). Die eingesetzten MHC-Tetramere erwiesen sich als hochspezifische Nachweismethode für den transgenen TCR von CL4-TCR Mäusen.

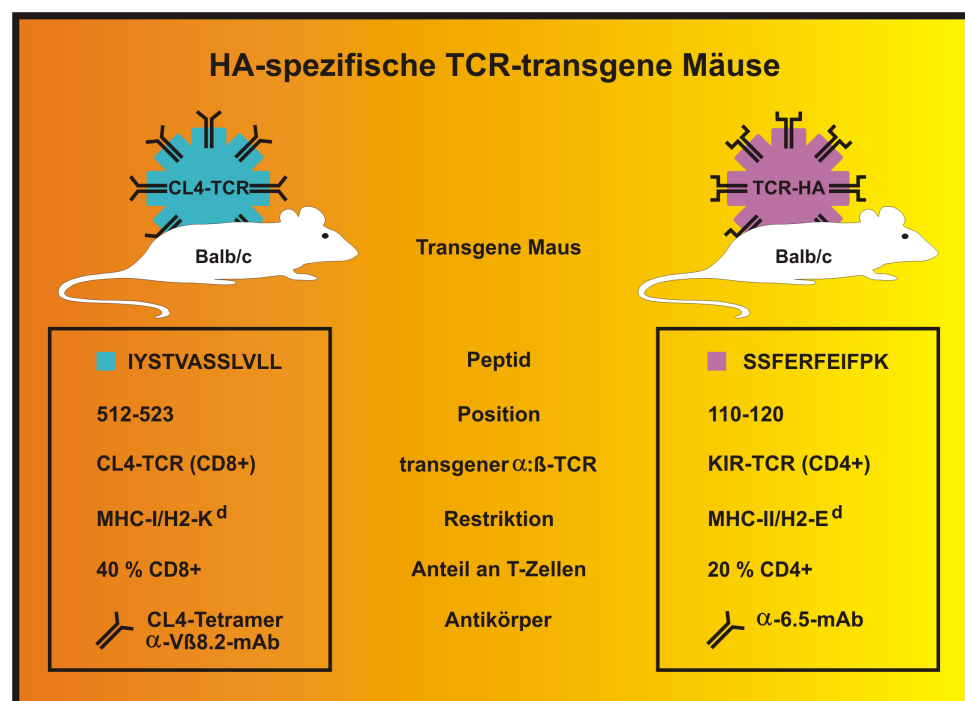


Abb. 1-10: Eigenschaften der HA-spezifischen TCR-transgenen Mauslinien

Die HA-spezifische TCR-transgene Mauslinie „TCR-HA“ (Kirberg *et al.*, 1994) richtet sich gegen das Aminosäurepeptid SSFERFEIPK (Hackett *et al.*, 1983). Der transgene $\alpha\beta$ -TCR erkennt das Peptid im Kontext von einem H2-E^d-(MHC-II)-Molekül, welches das Restriktionselement für die Präsentation des Peptids darstellt. Ca. 20% der sich entwickelnden CD4-positiven T-Zellen dieser Mauslinie tragen einen funktionellen transgenen $\alpha\beta$ -TCR, der auf seiner Oberfläche mittels des idiotypischen Antikörperklons 6.5 nachgewiesen werden kann (Weber *et al.*, 1992). Neben der großen T-Zellpopulation CD4-positiver T-Zellen entwickelt sich im Thymus von BALB/c-Mäusen (H-2^d) auch eine kleine Population CD8-positiver T-Zellen, die ebenfalls einen transgenen $\alpha\beta$ -TCR exprimiert. Im Gegensatz zu gewöhnlichen CD8-positiven T-

Zellen erkennen diese Zellen ihr Antigen auf H2-E^d-(MHC-II)-Molekülen, was eine Ausnahme zu der immunologischen Regel darstellt, dass MHC-II restringierte TCR immer von reifen CD4-positiven T-Zellen exprimiert werden müssen (Kirberg *et al.*, 1994).

1.5.4 HA x TCR-HA und HA x CL4-TCR Mausmodelle

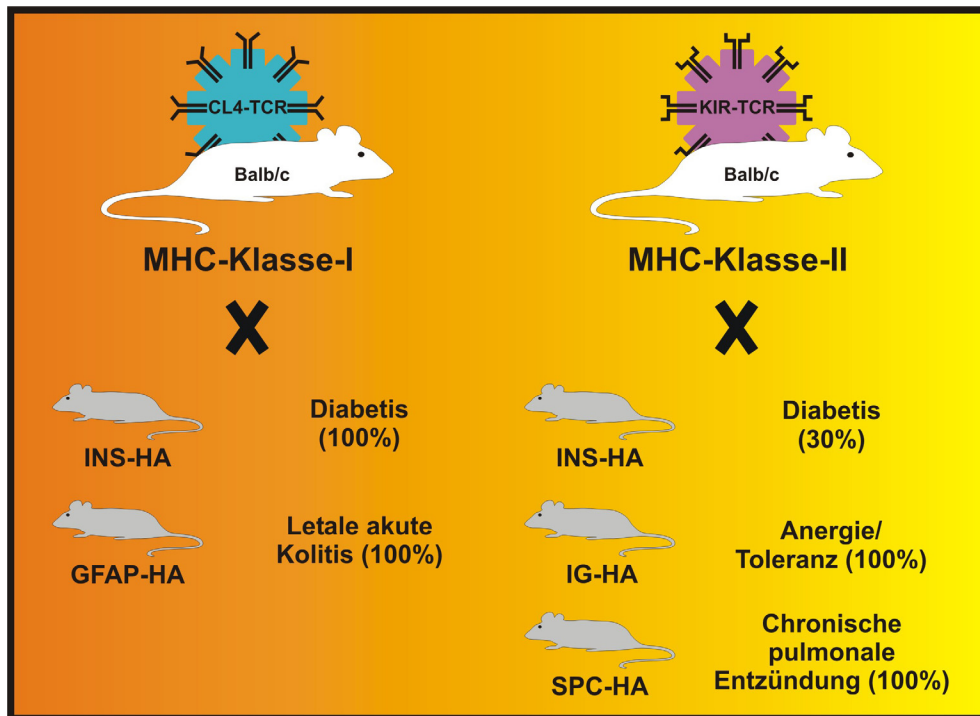


Abb. 1-11: Übersicht der HA-spezifischen TCR-transgenen Mausmodelle

Die Spannweite der ausgelösten immunologischen Zustände variiert von einer totalen Anergie (Ilgk-HA-Modell) bis hin zur akuten letalen Kolitis (GFAP-Modell).

Die beiden HA-spezifischen TCR-transgenen Linien wurden bereits erfolgreich in anderen HA-Modellen eingesetzt. In Anlehnung an diese bereits etablierten Modelle soll auch das HA-spezifische Kolitismodell für den Darm aufgebaut werden. Abb. 1-11 gibt eine Übersicht über die bereits etablierten unterschiedliche HA-Modelle. Die Expression des HA unter der Kontrolle des Insulin-Promotors führt im Pankreas zur Diabetes. Im TCR-HA Modell bricht die Erkrankung bei 30%, im CL4-TCR Modell bei 100% der Mäuse aus (Sarukhan *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1996). Dieser Unterschied in der Penetranz der Erkrankung weist darauf hin, dass im MHC Klasse-I-Modell der Verlauf der Entzündung aggressiver als im MHC-Modell verläuft. Diese Tatsache bestätigt sich auch im bereits im Kap. 1.4.4.2 beschriebenen zweiten CL4-TCR Modell,

wo die Expression des HA in Glia-Zellen des Darms unter dem GFAP-Promotor⁸ zur letalen Kolitis aller Mäuse innerhalb von 10 Tagen führt (Cornet *et al.*, 2001).

In einem in unserer Arbeitsgruppe parallel zum Darm-HA-Modell aufgebauten Lungen-Modell, welches das HA-Protein unter dem SPC-Promotor⁹ exprimiert, kommt es hingegen im TCR-HA Modell zu einer chronischen Entzündung doppelt-transgener Mäuse. Gänzlich im Kontrast zu den bisher beschriebenen HA-Modellen löst die Expression des HA unter einem Ig κ -Promotor¹⁰ in B-Zellen die Anergie von spezifischen T-Zellen, und nicht etwa eine Entzündung aus (Kalberer *et al.*, 1997).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit war der Aufbau eines enterozytenspezifischen transgenen Mausmodells, welches die Untersuchung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ermöglichen soll. Zu diesem Zweck wurden im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene transgene Mauslinien generiert werden, die das virale Hemagglutinin-Protein als Modellantigen im Darm exprimieren. Um eine möglichst exklusive Expression des HA im Darm zu erreichen, wurden hierfür Gewebespezifische Darmpromotoren (Villin-, IFABP- und FABPi-Promotor) verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die durch Oozyteninjektion generierten transgenen Mauslinien phänotypisch charakterisiert werden. Den Schwerpunkt bildete hier die Analyse der HA-Expression. Die Stärke der Expression des HA in den verschiedenen Geweben und Mauslinien wurde auf mRNA- und Protein-Ebene bestimmt und miteinander verglichen.

Im weiteren Verlauf beschränkte sich diese Arbeit auf das Villin-HA Modell. Zunächst sollte dieses durch einen adoptiven Transfer HA-spezifischer Zellen auf seine Funktionsfähigkeit untersucht werden. Die transferierten transgenen TCR-HA Zellen sollten durchflusszytometrisch analysiert und die Infiltration der Lymphozyten in Darmbiopsien anhand von histologischen Schnitten belegt werden.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollten Villin-HA Mäuse in TCR-transgene Linien eingekreuzt werden. In den so entstandenen doppelt-transgenen Mausmodellen sollte die zentrale Frage beantwortet werden, ob es in diesen Mäusen aufgrund der

⁸ GFAP – engl. **G**lial **F**ibrillary **A**cidic **P**rotein

⁹ SPC – engl. **S**urfactant **P**rotein **C**

¹⁰ Ig κ – **I**mmunoglobulin-**K**appa-leichte-Kette

Präsentation des Selbstantigens HA zu autoimmunen Entzündungsprozessen oder aber zu einer klonalen Deletion bzw. zur Toleranzinduktion kommt. Der Einsatz beider TCR-transgener Mausmodelle ermöglichte hier einen analysierenden Vergleich zwischen MHC-I- und MHC Klasse-II-vermittelten Immunantworten in Villin-HA Mäusen. Die durch Kreuzung entstandenen Modellsysteme wurden mit histologischen, molekularbiologischen und immunologischen Methoden charakterisiert.

2 Material und Methoden

Reagenzien und Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in analytischer Qualität von den Firmen Roche, Roth, Merck, Fluka und Sigma bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore, Eschborn. Alle hitzestabilen Puffer und Lösungen für molekular- und zellbiologische Anwendungen wurden bei 121° C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Die verwendeten Plastikwaren wurden von Eppendorf (Hamburg), Costar (Bodenheim), Falcon (Heidelberg) und Greiner (Frickenhäusen) steril bezogen.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Standardpuffer und –medien

Tab. 2-1: Standardpuffer und Medien für molekularbiologische Methoden

LB Medium 1% (w/v) Bacto-Tryptone (Difco) 0.5% (w/v) Hefe Extrakt (Difco) 0.5% (w/v) NaCl pH 7 Zur Herstellung von LB Agar wurden 1,5% (w/v) Bacto Agar (Difco) addiert.	SOC Medium 2% (w/v) Bakto-Tryptone 0.5% (w/v) Hefe Extrakt 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose	10 x TBE 108 g Trisaminomethan 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml mit H ₂ O
TE Puffer 10 mM Tris/HCl pH 8,0 1mM EDTA	6x DNA Gelladepuffer 30% (v/v) Glycerin 10 mM, 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenxyanol	50 x TAE 242 g Trisaminomethan 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml mit H ₂ O

2.1.2 Klonierung der transgenen Konstrukte

2.1.2.1 Bakterienstämme

E. coli sure

e14⁻ (McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^R) uvrC [F' proAB lacI^QZDM15 Tn10 (Tet^R)]

Die Inkubation des Bakterienstammes erfolgte auf einem Schüttler in LB Medium bei 37° C und 200rpm oder auf LB-Agar Platten. Zu Selektionszwecken wurde dem Medium das Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml, Roche) zugesetzt. 1 ml einer Übernacht-(ÜN)-Kultur wurde kurz abzentrifugiert und das Pellet in 500µl LB-Medium resuspendiert und 500 µl 60 %iges (v/v) Glycerin addiert. Die Bakterien wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70°C aufbewahrt.

2.1.2.2 Klonierungsvektoren

Die zur Generierung von transgenen Mäusen benötigten HA-Konstrukte wurden zu Beginn dieser Arbeit hergestellt. Klonierungsvektoren wurden verwendet, um die benötigten genetischen Elemente schrittweise zum Transgen zusammenzufügen. Vektoren und Vektorkonstrukte wurden in TE-Puffer pH8.0 bei -20°C gelagert. Folgende Klonierungsvektoren wurden verwendet:

- pGEM®-5Zf(+) Vektor (Promega)
- pGEM®-T Vektor (Promega)
- pBluescript II KS vector (Stratagene)

2.1.2.3 Enzyme

Die zur Klonierung und Kontrolle der Konstrukte benötigten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen NEB (Frankfurt), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und Promega (Mannheim) bezogen.

- T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim)
- Alkalische Shrimp Phosphatase (Boehringer Mannheim, Mannheim)
- T4 DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)
- Klenow-Fragment aus DNA Polymerase I (NEB (Frankfurt)
- Pfu-Polymerase (Promega, Mannheim)
- Taq Polymerase (Promega, Mannheim)

2.1.2.4 Enzymatische Modifikation von Plasmiden

Die Restriktionsverdau für die entsprechenden Endonukleasen wurden jeweils in den mitgelieferten Puffern und gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei notwendigen PCR-Klonierungen (Villin-HA Transgen) wurde zur Vermeidung von

Sequenzmutationen eine PFU-Polymerase mit einer „Proof-Reading“-Funktion und einer niedrigen Fehlerrate eingesetzt. Zur Erzeugung von glatten Enden („blunt ends“) wurden restriktionsverdaute DNAs entweder bei Bedarf mit Klenow-Fragment aus DNA Polymerase I oder mit T4 DNA-Polymerase in wässriger Lösung für 30 min bei 37° C inkubiert und aufgefüllt. Zur Inaktivierung wurden die Proben anschließend für 10 min auf 70° C erhitzt. Die Religation kompatibler DNA-Enden wurde durch 30 minütige Dephosphorylierung mit Alkalischer Shrimp-Phosphatase unterbunden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/50 Volumen 0,5 M EDTA pH 8 und Inkubation bei 70° C für 10 Minuten gestoppt. Ligationen wurden in 20µl-Ansätzen durchgeführt, das molare Verhältnis von Vektor zu Insert variierte dabei in Abhängigkeit der zu erwartenden Ligationseffizienz und den verwendeten Größen der DNA-Fragmente zwischen 1:3 und 1:20. Ligationsansätze wurden nach Zugabe von 1µl T4-Ligase (Promega) für 2 bis 16 Stunden bei 8°C oder 16 C inkubiert. Alle generierten Konstrukte wurden durch Restriktionsverdaus überprüft, teilweise wurden zusätzlich auch Kontroll-PCRs mit einer Taq-Polymerase durchgeführt.

2.1.2.5 Elektroporation von Bakterienzellen

2.1.2.5.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompenter E. coli sure-Bakterien wurden 500ml LB-Medium mit 2.5ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,5-0,8 bei 37°C und 300rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in einem Eiswasserbad für 10 bis 15 Minuten heruntergekühlt und für 20 min bei 4.200rpm bei 2°C zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor J-6M). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in 500ml eiskaltem deionisierten Wasser suspendiert. Nach zwei weiteren Zentrifugationsdurchgängen, die unter gleichen Bedingungen erfolgten, wurden die Zellen in 1ml 10% (v/v) Glycerin suspendiert und in 50µl Aliquots in N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die Kompetenz der Bakterien zur Aufnahme der Plasmide wurde mittels einer Kontrolltransformation mit dem Vektor pc-DNA3.1 überprüft.

2.1.2.5.2 Transformation von elektrokompenten Zellen

Zur Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit 1µl des Ligationsansatzes für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine

Elektroporationsküvette (0,2cm, Bio-Rad, München) überführt und im Gene Pulser (Biorad) einem Stromimpuls ausgesetzt (200Ohm, 25µF, 2,5KV). Sofort darauf wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt, in ein 15 ml Röhrchen transferiert und für 30 min bei 37°C mit 300rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Transformationsansätze in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten, die zur Selektion mit 100µg/ml Ampicillin versetzt wurden, ausplattiert.

2.1.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

2.1.2.6.1 Alkalische Lysis Minipräparation

Für Kontrollrestriktionen von Plasmiden und zu Klonierungszwecken wurde ein alkaliner Lysis-Prep durchgeführt (Birnboim and Doly, 1979). Dazu wurden 2ml einer ÜN-Kultur der Bakterien in einer Tischzentrifuge für 20 Sekunden bei maximaler g-Zahl pelletiert und in 100µl GTE-Puffer resuspendiert. Nach 5 Minuten wurden die Bakterien durch die Zugabe von 200µl NaOH/SDS Lösung auf Eis aufgeschlossen und denaturiert. Dann wurden 150µl 5M Kaliumacetatlösung hinzupipettiert und gevortext. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 5 min auf Eis wurden die aufgeschlossenen Zellbestandteile in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 800µl 96% Ethanol für 30 min bei –20°C präzipitiert. Es schlossen sich weitere Zentrifugationsschritte zur Pelletierung an. Hierzu wurde die DNA-Lösung zunächst für 20min bei 13000rpm und 4 C zentrifugiert, das Pellet wurde mit 1ml 70%igem Ethanol (eiskalt) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei 37°C für 5 min getrocknet und in 30µl TE-Puffer, versetzt mit 1µl DNase-freier RNase (10mg/ml) aufgenommen. Alle Plasmid-DNA-Lösungen wurden bei –20°C gelagert.

Tab. 2-2: Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA

GTE-Lösung	NaOH/SDS-Lösung	5M Kaliumacetat, pH4.8
50 mM Glukose	0.2N NaOH	29.5ml Eisessig ad 100ml H ₂ O
25mM Tris-Cl, PH8.0	1% (w/v) (SDS)	Durch Zugabe von KOH-Granulat einen
10mM EDTA		pH-Wert von 4.8 einstellen

2.1.2.6.2 Plasmidisolierung mit Hilfe von Chromatographie-Säulen

Nucleospin Plasmid-Kit, Nr. 740588 (Macherey & Nagel, Düren)

Nucleobond AX500 Plasmid-Kit, Nr. 740574 (Macherey & Nagel, Düren)

Zur Herstellung hochreiner DNA-Lösungen, insbesondere für Sequenzierungen der Konstrukte wurden Anionenaustauscher Chromatographie-Säulen und Reagenzien aus Macherey & Nagel Kits zur Isolation von DNA gemäß den Produktbeschreibungen verwendet. Zur Produktion kleiner Mengen und großer Mengen an Plasmid-DNA wurden die Kits Nr. 740588 und 740574 eingesetzt.

2.1.2.7 Analytische Gelelektrophoresen

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten genutzt. Die Agarosekonzentration innerhalb der verwendeten Gele wurde entsprechend der Größe der zu trennenden DNA Fragmente gewählt. In der Regel wurden zur Analyse von PCR-Produkten und zur Auftrennung von mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNAs 1%ige Gele benutzt. Die Agarose (Roth) wurde entweder in 1x TAE-Puffer oder 1x TBE-Puffer in einer Mikrowelle vollständig aufgelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60° C wurden 5µl des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid (Stocklösung 10mg/ml) zu 100ml der Agarose hinzugefügt. Anschließend wurden die Gele im Gelträger gegossen und auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt.

Die zu analysierenden Versuchsansätze wurden mit 6xDNA Gelladepuffer versetzt und in die Taschen des erstarrten Gels pipettiert. Zumeist wurden ein HindIII geschnittener λ -(Lamda)-Phage oder eine 100bp DNA ladder (Fermentas) als Größenmarker verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte entweder in 1xTAE- oder 1xTBE-Puffer in kleinen, mittleren und großen Gelkammern (Biozym, Göttingen). Die Feldstärke betrug in Abhängigkeit der gewählten Parameter 2 bis 8V/cm². Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und dokumentiert.

2.1.2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Ligation von geschnittenen DNA-Fragmente wurden diese zunächst mittels eines präparativen Agarosegels aufgereinigt und die benötigten Fragmentgrößen aus dem Gel isoliert. Dazu wurde das High Pure PCR Product Purification Kit (Kat.-Nr. 1732676, Boehringer Mannheim, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet und mit den mitgelieferten Chromatographie-Säulen aufgereinigt. Anschließend konnte die Konzentration der isolierten Fragmente in einem analytischen Gel anhand der Intensität der Banden und den bekannten Konzentrationen der einzelnen DNA-Fragmente des verwendeten Größenmarkers abgeschätzt werden.

2.1.2.9 Phenolisierung von Nukleinsäurelösungen

Bei verschiedenen Gelegenheiten wurden Nukleinsäurelösungen einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, um Kontaminationen an Proteinen bzw. Enzymen zu entfernen. Hierfür wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:1 mit Phenol gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe eines gleichen Volumens an Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) wurden die Proben kurz geschüttelt und bei maximaler *g*-Zahl für 10min bei 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die wässrige, Nukleinsäuren enthaltende Phase wurde abgenommen und die enthaltenden Nukleinsäuren wurden gefällt und umgepuffert (s. Kap. 2.1.2.10).

2.1.2.10 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Weiterverarbeitung der DNAs mussten DNA-Fragmente oder Plasmide gefällt und umgepuffert werden. Zur Fällung von DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumen eiskaltes 100 % Ethanol zugegeben. Anschließend wurde für 15 min bei -80 °C inkubiert und 20 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert.

2.1.2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen wurden mit Hilfe eines BA Spektralphotometers (Eppendorf) in einer Quarzküvette photometrisch bestimmt. Die Konzentration von DNA und RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Zur Kontrolle der Reinheit der Nukleinsäuren wurde der Quotient A260/A280 ermittelt, wobei Werte zwischen 1,80 und 2,00 eine hohe Reinheit der DNA-Lösungen belegen. Unreine Nukleinsäurelösungen wurden entweder nochmals aufgereinigt oder verworfen.

2.1.2.12 Polymerasekettenreaktion

Zur Anwendung von PCR-Techniken wurden die hierfür verwendeten Oligonukleotide mittels Primer Select-Software (Lasergene) ausgewählt, in HPSF gereinigter Form von MWG-Biotech (Ebersberg) oder von GIBCO-BRL (Eggenstein) bezogen und in TE-Puffer als 100 µM Stocklösungen bei -20° C aufbewahrt. Von den Stocklösungen der Primer wurden 5µM Gebrauchslösungen hergestellt, die beide zur Amplifikation benötigten Primer enthielten.

2.1.3 Detektion transgener Mäuse

Zur Identifizierung transgener Mäuse wurden mit genomischer DNA Polymerasekettenreaktionen (PCR) zum Nachweis der Transgene durchgeführt.

2.1.3.1 Isolierung genomischer DNA

Als Ausgangsmaterial zum Nachweis der genomischen Integration der Transgene und zur Identifizierung von HA- und TCR-transgenen Tieren wurde genomische DNA aus den Mäuseschwänzen verwendet. Zur Isolierung genomischer DNA wurde das Nucleospin Tissue-Kit (Nr. 740952, Macherey & Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Genomische DNA-Präparationen wurden routinemäßig von allen Tieren angefertigt und bei 4°C gelagert.

2.1.3.2 PCR zur Identifizierung transgener Mäuse

Zur Identifizierung HA- und TCR-transgener Mäuse wurden PCR-Amplifikationen mit genomischer DNA aus Mäuseschwänzen durchgeführt. Tab. 2-3 listet die hierfür verwendeten Primerpaare auf, nachfolgend sind die Reaktionsansätze und verwendeten Amplifikationsparameter angegeben. Die Amplifikationsreaktionen erfolgten in einem Volumen von 20µl im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen).

Alle PCR-Reaktionen wurden auf dem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt und nach der Amplifikation mit 6x Ladepuffer versetzt und auf 0.5 bis 1.0%igen Agarose-Gelen analysiert.

Tab. 2-3: Oligonukleotidprimerpaare zur Detektion transgener Mäuse

Transgen	forward und reverse Primer	T _M
Villin-HA	5'-CCTTAAGCCGCTGTGGCTGTCTT-3' 5'-TTACTGTTAGACGGGTGATGAATA-3'	55.6°C
IFABP-HA	5'-TGTTTGTCTTTTGGCTGGAGTGGA-3' 5'-GGTTTGCCTTCATTTGGTTGTT-3'	56.5°C
FABPi-HA	5'-TTTTATCGTTGACCATTGCTCTC-3' 5'-ATAGTTTTCCGTTGTGGCTGTCTT-3'	59.0°C
HA	5'-TATTCATCACCCGCCTAACAGTAA-3' 5'-CAGTCCATCCCCCTCAATAAAAC-3'	55.1°C
CL4-TCR	5'-GCAGGGCTGAAAGAACAGCAA-3' 5'-GCTTCCTCCAGAATTGAGGC-3'	62.0°C
TCR-HA	5'-TAGGAGAAAGCAATGGAGAC-3' 5'-GTACCTGGTATAACACTCAG-3'	58.0°C

Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion

1,0µl genomische DNA aus Mäuseschwänzen
 2,0µl 10x Reaktionspuffer mit 10mM MgCl₂
 2,0µl dNTP Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
 1,0µl 5µM forward and 5µM reverse Primer
 0,2µl (2U) Taq-Polymerase
 ad 20 µl mit H₂O

Programmierung des T3-Thermocyclers (Biometra)

94°C 300 sek		Initiale Denaturierung
94°C 45 sek	}	Exponentielle Amplifikation, 35 Zyklen
T _A °C 30 sek		
72° C 45 sek		
72° C 300 sek		Terminale Elongation

2.1.3.3 Southern Blots

Tab. 2-4: Lösungen und Reagenzien zur Durchführung von Southern Blots

20x SSC-Puffer 3 M NaCl 0.3M Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O	Transferpuffer 0.4 M NaOH 0.6M NaCl	Neutralisierungspuffer 0.5M Tris HCl pH7.0 0.4M NaOH
Depurinierungslösung 0.25 M HCl	0.4M NaOH	Hybond N+ Nylonmembran (Amersham, UK)
Rediprime Labelling Kit (RPN 1633, Amersham, UK)	[α-32P]-dCTP (AA005, Amersham, UK)	Chromatographie-Säulen (G25 Sephadex, Pharmacia)
Ultrasch (Ambion) Hybridisierungslösung	Heringssperm (Sigma-Aldrich)	20% SDS-Lösung
Stringenter Waschpuffer 0.1% SSC/0.1% SDS-Lösung	Waschpuffer 2.0xSSC/0.1% SDS-Lösung	

Southern Blots wurden zum Nachweis der Integration von Transgenen im Genom gentechnisch modifizierter Mäuse verwendet. Mit dieser Methode ließ sich die Kopienanzahl der integrierten Transgene genauer bestimmen. Zu diesem Zweck wurde genomische DNA aus Mäuseschwänzen isoliert (s. Kap. 2.1.3.1), mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und nach einer Gelelektrophorese mittels eines alkalinen Transfers auf eine Hybaid N+ Nylonmembran geblottet. Dieser Blot wurde

mit einer radioaktiv markierten HA-spezifischen Sonde zum Nachweis der Integration der Transgene hybridisiert. Die Radionukleotide und damit die Lokalisation der HA-spezifischen Sonde ließ sich auf Phosphorimager-Platten visualisieren.

2.1.3.3.1 Restriktionsverdau der genomischen DNA

1:100 Verdünnungen der genomischen DNA-Proben wurden photometrisch analysiert, um deren DNA-Gehalte und Reinheit bei 260nm Wellenlänge zu überprüfen (s. Kap. 2.1.2.11). In einigen Fällen wiesen die gemessenen Proben Proteinkontaminationen auf, entsprechende Proben wurden phenolysiert und deren DNA-Gehalt anschließend nochmals photometrisch bestimmt (s. Kap. 2.1.2.9). In der Regel wurden für Southern Blots 10µg genomische DNA eingesetzt. Die generierten DNA-Proben wurden in einem Volumen von 500µl über Nacht mit 50 U Bam HI (NEB) restringiert, es schloss sich eine DNA-Fällung mit 3M Na-Acetat an (s. Kap. 2.1.2.10). Die Proben wurden in 25µl TE-Puffer aufgenommen.

Ansatz für den Restriktionsverdau

x µl DNA (~10µg)
50 µl Bam HI-Puffer
50µl BSA 1:10
5 µl = 50 U Bam HI
ad 500µl H ₂ O

2.1.3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die generierten Proben wurden auf einem 1% TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei 80 Volt bei einer Dauer von ca. 3,5h. Nach der Elektrophorese wurden die Gele photographisch dokumentiert und auf die zu blottende Größe zugeschnitten. Es schloss sich die Depurinierung der Gele an. Dazu wurden die Gele für 7 min in 0,25M HCl depuriniert, um große DNA-Segmente (>10 kb) zu fragmentieren und somit leichter transferieren zu können. Anschließend wurden die Gele kurz in 0,4M NaOH-Lösung gewaschen.

2.1.3.3.3 Blotten der Gele

Die Blotting-Apparatur wurde gemäß Abb. 2-1 zusammengebaut. Geblottet wurde für mindestens 8h, als Transferpuffer wurde 0.4M NaOH/0.6M NaCl-Lösung verwendet.

Im Anschluss wurde die Nylon-Membran für 2 min in 0.5 M Tris-HCl 0.6 M NaCl pH7.0 gewaschen und danach für eine Stunde bei 80°C inkubiert, um die transferierten DNA-Moleküle durch Hitzeeinwirkung auf die Membran fixieren.

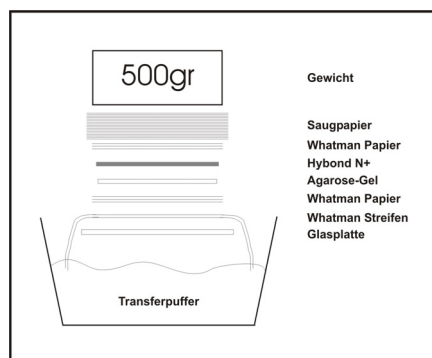


Abb. 2-1: Aufbau der Blotting-Apparatur

2.1.3.3.4 Sondengenerierung

Zur Sondengenerierung wurde mittels einer PCR-Amplifikation eine HA-spezifische Sonde mit einer Größe von 600bp generiert. Das PCR-Produkt wurde zweimal über ein präparatives Gel aufgereinigt (s. Kap 2.1.2.8). Anschließend wurde die Konzentration der DNA in einem analytischen Gel bestimmt.

Primerpaar zur Sondengenerierung

Name	forward und reverse Primer	T _M
600bp HA-Sonde	5'- TCAGTGTTCATTCATTTCGAAAGATTC -3' 5'- GTATTTTGGGCACTCTCCTATTGT -3'	55.0°C

Zur radioaktiven Markierung der 600bp-HA-Sonde wurde das Rediprime Labelling Kit (Amersham) verwendet. Dazu wurden 25ng der 600bp-HA-Sonde in 45µl TE-Puffer für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Die DNA wurde nun zum Reaktionsgefäß des Reprime-Kits pipettiert, welches dATP, dGTP und dTTP, Random-Hexanukleotidprimer und eine Klenow-Polymerase enthielt. Zuletzt wurden 5µl der [α -32P]-dCTP-Nukleotide (50µCi) hinzugegeben, die Lösung mit einer Pipette vorsichtig gemischt und das Reaktionsgefäß für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.2 M EDTA abgestoppt.

Zur Abtrennung der Sonde von störenden Primern und Nukleotiden wurden G25 Sephadex-Chromatographie-Säulen (Pharmacia) verwendet. Dazu wurde der Klenow-Reaktionsansatz entsprechend dem Protokoll des Herstellers auf die Säule pipettiert und

für 800g und 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die radioaktiv markierte Sonde und wurde in einem Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen.

Der Einbau des [α - ^{32}P]-dCTPs wurde im Szintillator mit 1 μl der Sondenlösung in 100 μl H_2O in einem entsprechenden Messröhrchen am Win Spectral Liquid Scintillation Counter (Wallac) vermessen. Die spezifische Aktivität der ^{32}P -markierten Sonde lag in der Regel bei $0,5\text{-}1,0 \cdot 10^9$ cpm pro μg DNA.

2.1.3.3.5 Hybridisierung

Die Prähybridisierung der Blots wurde bei 42°C in mittleren 20ml Hybridisierungsflaschen (Hybaid) mit 12.5ml UltraHyb-Lösung (Ambion) und 125 μl Heeringssperm im Micro-4 Hybridisierungssofen (Hybaid) bei niedriger Drehzahl des Rotors für 30 min vorgenommen. Zuvor war der Heringssperm zur Denaturierung für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und dann im Eisbad schockgekühlt worden.

Zur Hybridisierung wurden anschließend 5 μl der ebenfalls denaturierten 600bp-HA-Sonde zu den Hybridisierungsflaschen hinzugegeben. Die sich anschließende Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Im Anschluss wurden die Blots zweimal mit einer nicht-stringenten (2% SSC/0.1% SDS) und danach zweimal mit einer stringenten Waschlösung (0.1% SSC/ 0.1% SDS) für 15 min bei 60°C gewaschen.

Zur Auswertung der Hybridisierung wurde das photoluminiszente Verfahren der Anregung von Phosphorimagerplatten genutzt, welches als Alternative zur Autoradiographie verwendet wurde. Entsprechend wurden Phosphorimagerplatten (Typ M) und Blots für eine Dauer von 2 Tagen in entsprechenden Imagerkassetten exponiert. Das Auslesen der Phosphorimagerplatten erfolgte dann am BAS 2500 Phosphorimager (Fujifilm), wo die Ergebnisse photographisch dokumentiert wurden.

2.1.4 Expressionsanalysen auf RNA-Ebene

Die Expression des Hemagglutinins wurde in den verschiedenen Geweben transgener Mäuse analysiert. Dazu wurde mRNA aus verschiedenen Geweben transgener Mäuse isoliert und zu cDNA transkribiert. Im nächsten Schritt wurden die generierten cDNA Proben einer HA-spezifischen PCR Amplifikation unterzogen. Hierfür wurden zwei verschiedene Techniken angewandt, die semiquantitative PCR und die quantitative Real Time PCR.

2.1.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Gewebeproben erfolgte mit Hilfe von Tri-Reagent (Kat.-Nr. TR 118, MRCgene, USA). Dieses homogene Reagenz enthält sowohl Phenol als auch Guanidinthiocyanat, um einerseits eine schnelle Lösung der im Gewebe enthaltenden RNA zu erreichen und andererseits RNase-Aktivitäten in der Lösung zu unterbinden (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Zur Isolierung von RNA aus unterschiedlichen Geweben von Mäusen wurden je Gewebeprobe ca. 50 bis 200mg verwendet. Zum Zellaufschluss wurden die Gewebeproben in 1ml Tri-Reagent (Kat.-Nr. TR 118, MRCgene, USA) zermörsert und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und maximaler g-Zahl in einer Tischzentrifuge pelletiert. Die überstehende RNA enthaltende Tri-Reagent-Lösung wurde zur weiteren Verwendung abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Durch Zugabe von 100µl BCP (1-Brom-3-Chlorpropan, Fluka) in einem Mischungsverhältnis von 10:1 wurde eine Trennung des Homogenats in organische und wässrige Phase eingeleitet. Die Proben wurden dazu für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und für weitere 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14.000g für 20 Minuten bei 4°C in einem Ausschwenkrotor zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die zu isolierende RNA enthielt, wurde vorsichtig mit abgeschnittenen 1000ml-Pipettenspitzen abgezogen (ca. 500µl) und in ein neues Cap transferiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol wurde die RNA nun für 10 min bei RT gefällt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 14.000g für 20 Minuten bei 4° C in einer Tischzentrifuge an.

Nach der Pelletierung wurde die überstehende Flüssigkeit vorsichtig mit einer gezogenen Glaspipette abgezogen. Abschließend wurden die Sedimente zweimal mit 0,5ml 75% Ethanol gewaschen und bei 14.000g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die RNA wurde nach einer kurzen Lufttrocknung in 50µl DEPC-behandelten H₂O aufgenommen und für 10 Minuten bei 56°C auf einem Schüttler gelöst. Die erhaltenen RNA-Proben wurden bei -70°C gelagert.

2.1.4.2 DNase I-Behandlung von RNA-Proben

Um Verunreinigungen von DNA in den isolierten RNA-Proben auszuschließen, wurden die generierten RNA-Proben direkt vor der cDNA-Synthese einem DNase I-Verdau unterzogen, dazu wurde die RNA mit 5 Enzymeinheiten RNase-freier DNase I (Kat-

Nr. 2222, Ambion, USA) gemäß den Angaben des Herstellers für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Entfernung der DNase I in den RNA-Proben durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:1 mit Phenol gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe eines gleichen Volumens an Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) wurden die Proben kurz geschüttelt und bei maximaler g-Zahl für 10min bei 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die wässrige, RNA enthaltende Phase wurde abgenommen und durch die Zugabe eines zehntel Volumens 3M Na-Acetat-Lösung und 1 Volumen Isopropanol für 15min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (14.000rpm, 20min, 4°C) wurden die Proben mit 500µl 75% Ethanol einmal gewaschen und erneut in der Tischzentrifuge pelletiert. Die RNA wurde nach einer kurzen Lufttrocknung in 20µl DEPC-behandelten H₂O aufgenommen und für 10 Minuten bei 56°C auf einem Schüttler gelöst. Die erhaltenen RNA-Proben wurden bei –70°C gelagert.

2.1.4.3 Reverse Transkription

Zur Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene war die reverse Transkription der generierten RNA-Proben zu cDNA erforderlich. Hierfür wurden jeweils 2,5µg RNA unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase (MLV RT Polymerase, Promega, USA) und von oligo-dT-Primern (Invitrogen) in komplementäre cDNA-Stränge umgeschrieben.

Die Anlagerung der oligo-dT-Primer erfolgte unter Verwendung von 2,5µg DNA und einem 1µl der oligo-dT-Primer in einem Volumen von 12,6µl in PCR Reaktionsgefäßen. Hierfür wurden die Proben zunächst für 10min auf 70°C erhitzt und dann für 2min auf Eis abgekühlt.

Für die reverse Transkription wurden zu den auf Eis gehaltenen Proben jeweils 4µl 5xErststrang-Puffer, 2µl DTT, 1µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,4µl RNAsin (40units/µl, Promega) hinzupipettiert und die Reaktion durch die Zugabe von 1µl MLV RT Polymerase gestartet. Die Einzelstrangsynthese erfolgte bei einer Temperatur von 42°C für 45min. Nach Beendigung der reversen Transkription wurde zu jeder Probe 40µl TE-Puffer hinzugegeben und eine weitere enzymatische Reaktion durch eine Inkubation von 5min bei 90°C unterbunden. Die Proben wurden zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.1.4.4 PCR zur semiquantitativen Expressionsanalyse

Klassische PCR-Amplifikationen wurden genutzt, um die Expression von HA in der mRNA transgener Mäuse semiquantitativ zu untersuchen. Bei erfolgreicher Amplifikation ließ sich ein spezifisches PCR-Produkt im 1%igen Agarosegel nachweisen, wobei die Intensität der gemessenen Fragmentbande einen semiquantitativen Rückschluss auf die Höhe der HA Expression zuließ. Parallel zur PCR mit HA-spezifischen Primern wurden auch Kontroll-PCRs zum Nachweis des Standardgens Ribosomales Protein 9 (RPS-9) vorgenommen. Amplifikationsreaktionen erfolgten in einem Volumen von 20µl im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen).

Tab. 2-5: Primerpaare zur semiquantitativen Expressionsanalyse

Transgen	forward und reverse Primer	T _M
HA	5'-TATTCATCACCCGCCTAACAGTAA-3' 5'-CAGTCCATCCCCCTTCAATAAAAC-3'	55.1°C
RPS9	5'-CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC-3' 5'-TGACGTTGGCGGATGAGCACA-3'	57.5°C

Standardreaktionsansatz für die PCR-Reaktion

1µl (~40ng) cDNA-Template
 2µl 10x Reaktionspuffer mit 10mM MgCl₂
 2µl dNTP Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
 1,0µl 5µM forward and 5µM reverse Primer
 0,2µl (2U) Taq-Polymerase (Promega, Mannheim)
 ad 20 µl mit H₂O

Programmierung des T3-Thermocyclers (Biometra)

94°C 120 sek	}	Initiale Denaturierung
94°C 15 sek		
T _M °C 30 sek		Exponentielle Amplifikation,
72° C 3 sek		30, 35 oder 40 Zyklen
72° C 300 sek		Terminale Elongation

2.1.4.5 Quantitative Realtime PCR

Die quantitative Real Time PCR oder auch Echtzeit-PCR stellt eine sensitivere Methode zur Quantifizierung spezifischer DNA-Templates in Nukleinsäurelösungen dar als die klassische semiquantitative PCR-Technik (s. Kap. 2.1.4.4). Im wesentlichen besteht ein

Real Time PCR Detektionssystem aus einem Thermocycler, einer optischen Detektionskamera und einem detektierbaren Fluoreszenzfarbstoff im Reaktionsansatz, welcher mit der enthaltenden DNA interagiert. Die mit der Amplifikation eines spezifischen DNA-Templates im Reaktionsansatz verbundene Zunahme der DNA-Fragmente führt zu einer erhöhten Anzahl interkalierender Fluoreszenzfarbstoffmoleküle in die DNA und somit zu einer verstärkten Fluoreszenzintensität (FI). Diese Fluoreszenzsignale werden von der CCD-Kamera vor und nach jedem Amplifikationszyklus gemessen (Higuchi *et al.*, 1993).

Nach Beendigung der Real Time PCR lassen sich dann die gemessenen Fluoreszenzintensitäten einer Reaktion gegen die Anzahl der durchgeführten Amplifikationszyklen auftragen und der Fluoreszenz-Schwellenwert oder C_T -Wert (Threshold Cycle) einer PCR berechnen. Der C_T -Wert gibt an, in welchem Amplifikationszyklus die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu Beginn einer PCR-Reaktion ist in der Regel nur eine Hintergrundfluoreszenz messbar, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Nukleinsäurekonzentration im Reaktionsansatz nicht detektierbar ist.

Die Berechnung der Template-Menge basiert auf der Annahme, dass zu Beginn einer PCR (C_T -Wert) die Amplifikation linear verläuft und in dieser Phase keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Produktinhibition die PCR-Reaktion nachteilig beeinflussen.

Gleichzeitig werden bei jeder PCR auch bekannte Standards des gleichen Templates amplifiziert, sodass sich eine Standardkurve erstellen lässt, anhand derer von einem bestimmten C_T -Wert auf eine bestimmte Templatekonzentration geschlossen werden kann.

Mit Hilfe der Real Time PCR sollte in dieser Arbeit die Expression von HA mRNA in unterschiedlichen Geweben verglichen werden. Darüber hinaus sollten am MoFlo-Sorter definierte und sortierte Zellpopulationen hinsichtlich der Expression verschiedener Gene analysiert und verglichen werden. Dazu wurden die zu analysierenden PCR-Reaktionsansätze mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Applied Biosystems) versetzt. SYBR Green I entfaltet aufgrund von Elektronenwechselwirkungen seine Fluoreszenz nur nach Interkalation in die DNA-Moleküle. Analysiert wurden die PCR Reaktionsansätze auf einem ABI PRISM 5700 cycler (Applied Biosystems). Alle in Tab. 2-6 angegeben Primer wurden zuvor getestet und die einzusetzende optimale Primerkonzentration für die Real Time PCR ermittelt.

Die gleichzeitige Analyse eines „house-keeping“ Gens (RPS9) diene der Normalisierung der Messergebnisse auf eine Standardtemplate-Menge, die Verwendung eines zweiten internen Fluoreszenzfarbstoffes (Reference dye) diene als interner Standard, um sicherzustellen, dass alle Ansätze gleiche Template-Konzentrationen enthielten. Eine Standard-Verdünnungsreihe der zu analysierenden Gene diene der Generierung einer Eichkurve, in der sich aus dem gemessenen C_T -Wert der Proben die relativen Template-Konzentrationen in den Ausgangsproben bestimmen ließen.

Tab. 2-6: Oligonukleotidprimerpaare zur quantitativen Expressionsanalyse.

Die Primer wurden vor Verwendung auf deren optimale Endkonzentration getestet, mit angegeben sind die jeweiligen Anlagerungstemperaturen (T_A).

Transgen	forward und reverse Primer	T_A
HA	5'-GTCCGGCATCATCACCTCAAAC-3' 5'-AACCGGCAATGGCTCCAAATAGAC-3'	58.0°C
RPS9	5'-CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC-3' 5'-TGACGTTGGCGGATGAGCACA-3'	57.5°C
PD-1	5'-GGAAATTCGTAGACTGGGGGACTG-3' 5'-TCACGGAGCTTTTGCCTGGTAA-3'	54.8°C
IL-10	5'-CTGGACAACATACTGCTAACC GACTC-3' 5'-ATTCTGGGCCATGCTTCTCTGC-3'	54.4°C
FoxP3	5'-CACCTGGCTGGGAAGATGG-3' 5'-AAGGGCAGGGATTGGAGCACT-3'	59.0°C
GATA-3	5'-ATCATGAAGCCCGAAAGCGACAGA-3' 5'-ATGGGATCCGGATTCAGTGGTTGG-3'	54.8°C
T-Bet	5'-CCGCTGGGGCCCCTTCTCCT-3' 5'-GCCCCGCTTCCTCTCCAACCAATC-3'	59.0°C
TNF- α	5'-CAA TGC ACA GCC TTC CTC ACA G -3' 5'-CCC GGC CTT CCA AAT AAA TAC AT -3'	49.7°C
IFN- γ	5'-AGGAACTGGCAAAAGGATGGTGA-3' 5'-TGTTGCTGATGGCCTGATTGTCTT-3'	52.6°C
IL-4	5'-AGCACCTTGGAAGCCCTACAGAC -3' 5'-GGACGCCATGCACGGAgAT -3'	55.5°C

Programmierung des ABI PRISM 7000 cyclor (Applied Biosystems)

94°C 10 min]	Initiale Denaturierung
94°C 10 sek		
T_M °C 60 sek		Exponentielle Amplifikation,
72°C 60 sek		40 Zyklen

Standardreaktionsansatz für die PCR-Reaktion

0,5µl (1 (~20ng) cDNA-Template
 5,0µl 10x Core PCR Puffer (Stratagene)
 2,5µl 50mM MgCl₂ (Stratagene)
 2µl dNTPs (je 20mM dATP, dCTP, dGTP dTTP, Stratagene)
 5µl SYBR Green I (1:2.000 in H₂O, Stratagene)
 8,0µl 50% Glycerol (Stratagene)
 1,5µl 100% DMSO (Stratagene)
 0,75µl Reference Dye (1:50 in H₂O, Stratagene)
 x µl forward primer (50-900nM)
 y µl reverse primer (50-900nM)
 0,5µl Sure Start Taq (Stratagene)
 ad 50 µl mit H₂O

2.1.5 Expressionanalysen auf Proteinebene

Tab. 2-7: Verwendete Puffer und Reagenzien zur Durchführung von Western Blots

Protein-Lysispuffer 20mM Tris-HCl 150mM NaCl 5mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100	Laemmli-Probenpuffer (2x) Tris 0,5 M, pH 6,8 25 ml Glycerin 20 ml SDS (10%) 40 ml β-Mercaptoethanol 2,0 ml Bromphenolblau 2 mg	1x Laufpuffer 25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1 % SDS auf pH8,3 einstellen
Trenngel (10%) 4,0 ml H ₂ O 3,3 ml 30 % Acrylamidmix 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS 4,0 µl TEMED	Sammelgel (5%) 1,4ml H ₂ O 0,33ml 30 % Acrylamidmix 2,5ml 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 20µl 10% SDS 20µl 10% APS 2,0µl TEMED	Transferpuffer (10 x) Tris Base 60 g Glycin 290 g ad 1600 ml Aqua bidest.
Rainbow marker (Amersham)	Mini Complete Proteasen Inhibitoren Cocktail (Roche) 2 Tabletten auf 5ml Protein-Lyis-Puffer	TBS-Tween-Puffer NaCl (5 M) 40 ml Tris 0,5 M, pH 6,8 40 ml Tween 20 2 ml ad 2000 ml Aqua bidest.
Absättigungslösung 10% (w/v) Casein in TBS-Tween-Puffer	Antikörperinkubationslösung 5% (w/v) Casein in TBS-Tween-Puffer	CM1.2 (Primärantikörper) mouse-α-HA 1:200

TBS-Puffer NaCl (5 M) 40 ml Tris 0,5 M, pH 6,8 40 ml ad 2000 ml H ₂ O	Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche)	α-mouse Sekundärantikörper Peroxidase-gekoppelt 1:5.000
--	--	---

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglichte es, Protein-Lysate ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen, um anschließend mit Hilfe von Western Blots spezifische Proteine nachzuweisen. Dazu wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, mit spezifischen Antikörpern markiert und ihr Vorhandensein mittels einer Chemoluminiszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Western Blots zum Nachweis des HA-Proteins im Dünndarmepithel Villin-HA transgener Mäuse angefertigt. Der Nachweis des HA-Proteins erfolgte mittels eines Peroxidasen-gekoppelten HA-spezifischen Antikörpers (CM1.2) durch die Freisetzung eines chemoluminiszenten Substrates.

2.1.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden Dunndärme von Mäusen präpariert, longitudinal geöffnet und auf Operationsgaze (Foliodrape Abdecktücher, Hartmann) aufgespannt. Mit einem Schaber wurde die obere Epithelschicht abgeschabt und in 1 ml Protein-Lysispuffer mit Proteasen-Inhibitoren (Mini Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Roche) aufgenommen.

2.1.5.2 SDS Page Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Mini Protean III-Kammern (Bio-Rad). Die 10% Acrylamidgele wurden in entsprechenden Gelträgersystemen gegossen und nach erfolgter Polymerisierung mit dem 5 %igen Sammelgel überschichtet. Die bereits fertig im zweifach konzentrierten Laemmli-Probenpuffer verdünnten Proben wurden 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend in die Geltaschen des polymerisierten Sammelgels aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Verwendung von 1x Laufpuffer für 2,5 h bei ca. 8 V/cm. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Rainbowmarker (Amersham) verwendet.

2.1.5.3 Western Blot

Die in den Polyacrylamid-Gelen enthaltenen Proteine wurden anschließend durch einen Sandwich-Transfer in einer Blotkammer auf eine Nitrozellulose-Membran (0,2µm, Sartorius) transferiert. Dazu wurde das Gel nach der SDS-Page-Elektrophorese passig auf zuvor in Transferpuffer getränkte Whatmanfilterpapiere gelegt. Anschließend wurde eine entsprechend zurecht geschnittene Nitrozellulosemembran auf das Gel gelegt, gefolgt von drei weiteren Whatmanfilterpapieren. Die Blotkammer wurde nun geschlossen, mit einem Gewicht beschwert und an das Netzgerät angeschlossen. Der Transfer wurde für 40 min bei 1mA/cm² durchgeführt.

2.1.5.4 Antikörpernachweis des Hemagglutinins

Zum Nachweis der Expression von HA-Protein wurde der Blot nach dem Transfer mit 10%iger Casein-Lösung über Nacht bei 4°C abgesättigt. Inkubationen mit Antikörpern wurden in 5%iger Casein-Lösung vorgenommen, dazu wurden der eingesetzte Primärantikörper CMI1.2 (mouse-α-HA mAb) in einer 1:200 und der mit Peroxidase (PO) gekoppelte Sekundärantikörper (rat-α-mouse-PO) in einer 1:5.000 Verdünnung verwendet. Die Inkubation der Blots in den Antikörperlösungen erfolgten für 60 min für den Primär- und für 30 min für den Sekundärantikörper bei RT auf einem Schüttler. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Blots jeweils zweimal für 5 und einmal für 15 min in TBS-Tween-Puffer gewaschen. Es schloss sich ein abschließender Waschschrift mit TBS-Puffer für 5 min an. Die Blots wurden nun mit einer chemoluminiszenten Substratlösung (Lumi Light Western Blotting Substrate, Roche) für 1 bis 2 min inkubiert. Nach Auswaschen des Substrates mit TBS-Puffer wurde ein Röntgenfilm (Biomax BMR1, Kodak) durch Auflage eines Blots belichtet und anschließend entwickelt.

2.2 Zellbiologische Methoden

Arbeiten für die Zellkultur wurden an sterilen Werkbänken (LaminAir HB2448S, Heraeus) ausgeführt. Bei allen notwendigen Zentrifugationen von Zellen wurde eine Zellkulturzentrifuge (Allegra 6KR, Beckmann-Coulter) verwendet. Die Kultivierung von Zellkulturen und Primärzellen aus der Maus erfolgte im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂. Primäre Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in MEM (minimal essential medium) kultiviert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS

(foetales calf serum, Gibco, 10270-106), 2mM L-Glutamin (Gibco) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) komplementiert wurde. Zur Bestimmung der Zellzahl und Diskriminierung von toten Zellen wurden Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau (Seromed) angefärbt. Die Auszählung erfolgte am Lichtmikroskop in Neubauer-Kammern.

Tab. 2-8: Medien und Puffer für die Zellkultur

MEM-Medium 10% (v/v) FCS (Gibco) 2 mM L-Glutamin (Gibco) 100 U/ml Pen/Strep (Gibco)	IMDM-Medium 10% (v/v) FCS (Gibco) 2 mM L-Glutamin (Gibco) 100 U/ml Pen/Strep (Gibco)	RPMI-Medium 10% (v/v) FCS (Gibo) 2 mM L-Glutamin (Gibco) 100 U/ml Pen/Strep (Gibco)
PBS-Puffer, pH7.0 8g NaCl 0,2 g KCl 14,3g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 2g KH ₂ PO ₄ ad 1000ml H ₂ O	FACS-Puffer PBS-Puffer 2% (v/v) FCS 2mM EDTA 0,1 % (v/v) Azid	PBS/FCS/EDTA-Puffer PBS-Puffer 2 % (v/v) FCS 2mM EDTA
PBS/ /EDTA-Puffer PBS-Puffer 3mM EDTA	HBSS (Gibco) Hanks buffered saline solution	Ficoll-Paque™ (Amersham) Dichte: 1.077g/cm ³
		Erythrozyten-Lysis-Puffer (Quiagen, Hilden)

2.2.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Zur Durchführung von Experimenten und Analysen mussten Einzelzellsuspensionen aus verschiedenen Organen von Mäusen hergestellt werden. Am Ende der Isolierung wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen an Puffer oder Medium aufgenommen und deren Zellzahl/ml bestimmt.

2.2.1.1 Blut

Zur Isolierung von Einzelzellen aus dem Blut wurden Mäuse aus dem Auge mittels einer Kapillare geblutet, mit PBS-Puffer 1:3 verdünnt und über einen 1ml Ficoll-Paque-Gradienten (Amersham) wurden die mononuklearen Zellen des Blutes angereichert. Dazu wurde das Mausblut bei RT für 20` und 2.000rpm ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde mittels einer Pasteurpipette der Interphasenring abgezogen und in

ein mit 2ml vorgefülltes Röhrchen mit PBS-Puffer überführt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10' bei 1.100 rpm und 4°C schloss sich an.

2.2.1.2 Thymus und MLN

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Thymus oder den MLN wurden die lymphatischen Organe präpariert und durch ein 100µm großes Zellsieb in eine Petrischale mit 1ml PBS/FCS/EDTA-Puffer vereinzelt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend für 10 min bei 1.100rpm und 4°C abzentrifugiert.

2.2.1.3 Milz

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Milzen wurden diese präpariert und in einer Petrischale mit 2 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer und einer Kanülenspritze (Microlance 3, 26G½, Becton Dickenson) ausgespült. Die Zellsuspension wurde zur Erythrozytenlyse für 5 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 1.100rpm und 4°C in einer Zellkulturzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, und die Zellen wurden erneut in FACS-Puffer gewaschen.

2.2.1.4 Intestinum

Zur Gewinnung von IEL und LPL wurde der Dünndarm präpariert und der Darminhalt mit PBS-Puffer und einer Spritze ausgespült. Anschließend wurde der Dünndarm in drei Stücke geschnitten, mit einer Schere longitudinal geöffnet, auf einer Operationsgaze (Foliodrape Abdecktücher, Hartmann) aufgespannt und Fettgewebe und Peyersche Plaques entfernt.

2.2.1.4.1 Intestinales Epithel

Um IEL aus dem intestinalen Epithel zu isolieren wurde die oben liegende Mukosa abgeschabt und in 50ml RPMI-Medium, zu welchem 7,8mg DTT (Dithiothreitol, Sigma) hinzugegeben wurden, aufgenommen. Zum Aufschluss des Gewebes wurde die Suspension für 15 min bei 37°C konstant gerührt und dann für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40ml HANKS/10% FCS-Medium aufgenommen, für 3 min gevortext und über eine mit 1,6g Glaswolle (Borosilicated Fiberglass, 5-7mm, Fisher Scientific) gepackte und zuvor mit 40ml HANKS/5mM Hepes-Lösung equilibrierte Säule (20ml-Spritze) filtriert. Mit weiteren 40ml HANKS/10% FCS-Medium wurde die Säule nachgespült. Beide Durchläufe wurden in 50ml Falcon-

Röhrchen aufgefangen und bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Zur Anreicherung von Lymphozyten wurde ein Ficoll-Gradient mit 5ml Ficoll und 5ml Zellsuspension durchgeführt. Der Interphasering wurde nach der Zentrifugation (2.000rpm, RT, ohne Bremse) abgenommen und zweimal mit PBS-Puffer/10% FCS gewaschen.

2.2.1.4.2 Lamina Propria

Zur Gewinnung von LPL aus dem Dünndarm wurde dieser in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten. Nachfolgend wurden die Darmstücke zweimal in 60ml PBS/EDTA-Lösung und anschließend zweimal in 15ml RPMI/ 1% FCS/ 1mM EGTA/ 1,5mM MgCl₂ für 10min bei 37°C und 200rpm gerührt. Nach jeder Inkubation wurde der Überstand abdekantiert und verworfen. Während dieses Vorgangs löste sich das Epithel vom Dünndarm. Die Flüssigkeit wurde danach durch ein grobes Metallsieb filtriert, die Darmstücke wurden mit einer Schere weiter verkleinert und mit PBS-Puffer gespült. Die Gewebestücke wurden nun in 40 ml RPMI/ 1% FCS/ 1mM EGTA/ 1,5mM MgCl₂ suspendiert, der zur Auflösung des Bindegewebes der Lamina propria mit 100 U/ml Kollagenase und 5mg/ml DNase versetzt worden war. Die Flüssigkeit wurde für 1,5 h bei 37°C und 200rpm inkubiert, durch ein Kleenex-Papier filtriert und für 10 min bei 1.000rpm und RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml IMDM-Medium aufgenommen und die mononuklearen Zellen über einen 5ml Ficollgradienten (2.000rpm, RT, ohne Bremse) angereichert. Zum Abschluss wurden die Zellen nochmals in IMDM-Medium gewaschen und bei 1.000 rpm für 10 min abzentrifugiert.

2.2.2 Automacs Depletion

Zur Isolierung von CD4⁺ T-Zellen wurde das CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Nr. 130-90-860) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden Lymphozyten aus Milz und MLN mit einem Cocktail aus biotinylierten Antikörpern (α -CD8a, α -CD11b, α -CD45R, α -DX5 und α -Ter-119) behandelt, um CD8⁺ T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen und Erythrozyten zu markieren. Danach wurde die Zellsuspension mit Mikrosphären (microbeads) inkubiert, die an α -Biotin-Antikörper gekoppelt waren und paramagnetische Eigenschaften aufwiesen. Im 1. Inkubationsschritt durch Antikörper biotinylierte Zellen wurden durch die α -Biotin-Antikörper erkannt, und somit an die Microbeads gebunden. Die Depletion der Microbead-gebundenen Zellen erfolgte über eine magnetische Separation in einer

Depletionssäule am Automacs (Miltenyi Biotec). Die Reinheit der isolierten CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft.

2.2.3 Antikörperfärbungen

Tab. 2-9: Verwendete Antikörper und Fluorophorkonjugate

Angegeben sind Name bzw. Spezifität, Herkunft, Fluorophor sowie eingesetzte Verdünnung der einzelnen Antikörper.

Name/Spezifität	Herkunft	Fluorophor	Hybridom/Hersteller	Verdünnung
6.5 (TCR-HA)	Ratte	FITC, Bio	14.3.d	1:500, 1:400
Vß8.2 (CL4-TCR)	Maus	FITC	F23.1	1:250
HA-Tetramer	---	PE	---	1:400
CD4	Ratte	FITC, PE, AP	GK1.5	1:1.600
CD8a	Ratte	FITC, PE, AP	53-6.7	1:800
CD25	Ratte	PE, AP, Bio	PC61	1:800
CD45RB	Ratte	Bio	C363.16A	1:1.000
CD62L	Ratte	Bio	Mel-14	1:1.000
CD69	Hamster	Bio	H1.2F3	1:1.000
Streptavidinkonjugate	---	PE, CyChrome, AP	Phar Mingen	1:1.500

Zum Nachweis spezifischer Oberflächenmarker auf Lymphozyten wurden monoklonale Antikörper (s. Tab. 2-9) eingesetzt, um Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Die verwendeten monoklonalen Antikörper wurden in Instituts-eigenen Hybridoma-Zelllinien hergestellt oder von den Firmen Sigma Immunotech und Becton Dickinson bezogen. In Vorversuchen wurden die optimale einzusetzende Endkonzentration an Antikörpern titriert.

Zur Markierung der Zellen mit Fluorophor-markierten Antikörpern wurden zwischen $1 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen in 50 µl FACS-Puffer in Rundloch-Mikrotiterplatten eingesetzt. Zu jedem Probenansatz wurden 50 µl der entsprechenden Antikörperlösung hinzugegeben, so dass sich die entsprechende Endkonzentration des jeweiligen Antikörpers ergab. Zumeist wurden die Probenansätze parallel mit mehreren unterschiedlich Fluorophor-gekoppelten Antikörpern inkubiert, um später Subpopulationen in den entsprechenden Proben zu analysieren. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 3 min bei 1.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert.

Wurden biotinylierte Antikörper verwendet, erfolgte die Markierung der Zellen mit den Fluorophoren in einem zweiten Inkubationsschritt unter Verwendung von PE (Phycoerythrin)-, CyChrome- oder AP (Allophycocyanin)-Streptavidin-Konjugaten

(Becton Dickinson). Dazu wurden die Zellen wiederum für 10 min auf Eis mit dem entsprechenden Streptavidin-Konjugat in 100µl FACS-Puffer inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wieder mit 1.000 rpm für 3 min abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Abschließend wurden die Proben in 200µl FACS-Puffer aufgenommen, der zur Diskriminierung am Durchflusszytometer mit Propidiumiodid (Endkonzentration 0,33µg/ml, Sigma) versetzt worden war.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einem fokussierten Laserstrahl¹¹, der auf einen Flüssigkeitsstrom gerichtet wird, welcher die zu vermessenden Zellen enthält. Die Zellen passieren nacheinander, in kleinen Flüssigkeitstropfen vereinzelt, den Laserstrahl, so dass jede Zelle hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften (Größe, Granularität, Fluoreszenz) vermessen werden kann. Das gestreute bzw. emittierte Licht wird auf Photodetektoren geleitet und dessen Intensität vermessen. Mittels der Durchflusszytometrie und einem entsprechend ausgerüsteten Durchflusszytometer lassen sich Zellpopulationen auch entsprechend ihrer biophysikalischen Eigenschaften sortieren.

Die Durchflusszytometrie wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die Expression spezifischer Moleküle auf der Oberfläche von Lymphozytenpopulationen zu analysieren. Dazu wurden Fluorophor-markierte Antikörper verwendet, mit denen spezifische Oberflächenmoleküle auf den Zellen markiert wurden (s. Kap. 2.2.3). Anhand der gemessenen Fluoreszenzen der Antikörper-markierten Zellen konnte die Expression der entsprechenden Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem FACS Calibur-System (Becton Dickinson) vorgenommen, was die gleichzeitige Analyse von bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzen ermöglichte. Zur Analyse der Ergebnisse wurde das Programm WinMDI 2.8 (Scripps Institute, USA) verwendet. Die Ergebnisse wurden entweder in Histogrammen oder in „Dot-plots“ dargestellt. Größen- und Granularitätsparameter wurden linear, die Fluoreszenzintensitäten hingegen logarithmisch aufgetragen.

¹¹ Ein Kryptonlaser wurde zur Anregung von FITC-, PE, PI und PerCP-Fluorophoren, ein Argonlaser zur Anregung von APC-Fluorophoren verwendet.

2.2.5 Sortieren von Lymphozyten mit der Durchflusszytometrie

Zur Durchführung bestimmter Experimente war es in einigen Fällen erforderlich, dass durch Antikörper markierte distinkte Lymphozytenpopulationen voneinander separiert und sortiert werden mussten. Dazu wurden die mit entsprechenden Antikörpern markierten Zellen am MoFlo-Sorter (Cytomation) auf Eis mit einer 75µm-Düse in MEM-Medium sortiert.

2.2.6 CFSE-Markierung von Lymphozyten

T-Zellen wurden mit CFSE (5-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester, Molecular Probes) markiert, um die Proliferation der Zellen in adoptiven Transfer-Experimenten in Villin-HA Mäusen nachzuweisen (s. Kap. 2.3.4). Dazu wurden isolierte Milz und MLN Lymphozyten gepoolt, enthaltende CD4⁺ T-Zellen mit dem CD4⁺ T Cell Isolation Kit (s. Kap. 2.2.2) angereichert und mit dem Farbstoff CFSE markiert. Zur Markierung der Zellen mit dem Farbstoff wurden die T-Zellen zunächst in RPMI ohne FCS gewaschen (1.000 rpm, 10 min, 4°C) und in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in MEM-Medium aufgenommen. Zur Zellsuspension wurde ein Volumen 5µM CFSE-Lösung hinzugegeben und für 8 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 2 Volumen an FCS hinzugefügt und die Zellsuspension für weitere 5 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal in MEM-Medium gewaschen. Die Markierung der Zellen ließ sich mit der Durchflusszytometrie nachweisen.

2.2.7 Antigenspezifische Stimulationsassays

Zum Nachweis der *in-vitro* Proliferation von spezifischen Lymphozyten wurden Stimulationsassays mit HA-spezifischen Peptiden durchgeführt, in denen die Zellen in Gegenwart oder in Abwesenheit ihres spezifischen Peptides kultiviert wurden. Wurden T-Zellen in Folge der Präsentation ihres spezifischen Peptids auf APC aktiviert, so ließ sich dies über den Einbau von ³H-Thymidin (Tra-3, Amersham) in den Zellen nachweisen.

Zur Durchführung von Antigen-spezifischen Stimulationsassays wurden Lymphozyten aus Milz und MLN der zu untersuchenden Mäuse isoliert und auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in MEM-Medium verdünnt. Für einige Stimulationsassays war zuvor der Anteil spezifischer T-Zellen in der Gesamtkultur durchflusszytometrisch bestimmt

worden. Durch die Zugabe von BALB/c-Splenozyten zur höher konzentrierten Zellsuspension konnten unterschiedliche Gehalte an spezifischen T-Zellen ausgeglichen werden, so dass in allen Ansätzen eine identische Anzahl an spezifischen Lymphozyten für die Stimulationsassays eingesetzt wurden.

Für die Stimulationsassays wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen in 96well-Flachbodenplatten in 100µl MEM-Medium eingesetzt und die spezifischen Peptide¹² in den entsprechenden Verdünnungen in 100µl Medium zugesetzt. In einem Fall wurden $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen sortiert und von Antigen-präsentierenden Zellen getrennt (s. Kap. 3.4.6). Hier wurden $5 \cdot 10^5$ Splenozyten mit 3.000 rad bestrahlt und zusammen mit $2 \cdot 10^4$ antigenspezifischen Responderzellen pro well eingesetzt. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Peptide variierten zwischen den Experimenten und sind jeweils in den Abbildungslegenden angegeben. Anschließend wurden die Zellen für 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit mit 50µl 3H-Thymidin (1µCi mit einer spezifischen Aktivität von 5µCi/mmol) markiert. Nach einer 15 stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit einem Zellharvester (Inotech) geerntet, auf eine Nitrozellulose-Membranen überführt und fixiert. Nach Trocknung der Membranen wurden diese mit Szintillationsflüssigkeit befeuchtet und die Menge des eingebauten, in der Membran fixierten 3H-Thymidins am Szintillator (Trilux Microbeta 1450, Wallace) bestimmt.

Eingesetzte Peptide für die Antigen-spezifischen Stimulationsassays

CL4-TCR	IYSTVASSLVLL
TCR-HA	SSFERFEIFPK

2.3 Mausmodelle

2.3.1 Maushaltung

Die zur Verpaarung transgener Tiere benötigten BALB/c-Weibchen wurden von Harlan (Borchen) bezogen. Die Haltung der Mauslinien erfolgte im Rahmen des genehmigten Tierversuchsantrages (Akz.: 509.42502/07.-08.99) unter kontrollierten SPF-Bedingungen. Die Abwesenheit von Mauspathogenen wurde regelmäßig durch entsprechende Labortests kontrolliert.

¹² Nähere Einzelheiten zu den spezifischen Peptiden sind der Einleitung (s. Kap. 1.5.3) zu entnehmen.

2.3.2 Generierung transgener Mäuse

Die Generierung HA-transgener Mäuse erfolgte in Kooperation mit der Firma Ozgene (Canning Vale, Australia) durch Mikroinjektion der linearisierten Konstrukte in die Vorkerne befruchteter (C57BL/6JxDBA/2) F1 Oozyten, die aus superovulierten Weibchen gewonnen wurden. Die befruchteten Zygoten wurden in die Eileiter scheinschwangerer Ammenmäuse eingebracht (Gordon and Ruddle, 1985). Die Nachkommen wurden zum Nachweis der genomischen Integration des mikroinjizierten Konstruktes mit genomischer DNA aus der Schwanzspitze mittels einer HA-spezifischen PCR und Southern Blots analysiert. Für jedes mikroinjizierte HA-Konstrukt wurden drei ausgewählte transgene ‚founder‘-Tiere als Begründer von HA-transgenen Mauslinien mit BALB/c-Tieren weiterverpaart.

Zum Aufbau der TCR-transgenen HA-Mausmodelle war es erforderlich, die generierten Mauslinien auf einen BALB/c-Hintergrund zurückzukreuzen, um eine MHC-Kompatibilität zwischen transgenen TCR-HA oder CL4-TCR T-Zellen und den MHC-Molekülen zur Präsentation der beiden spezifischen HA-Epitope zu gewährleisten. Diese Rückkreuzungen dauern noch an und sind am weitesten für die Villin-HA transgenen Tiere fortgeschritten, die sich inzwischen in der 9. Rückkreuzungsgeneration befinden. FABPi-HA transgene und IFABP-HA transgene Tiere befinden sich zur Zeit in den 4. Rückkreuzungsgenerationen.

2.3.3 Expressionsanalysen von HA-transgenen Mäusen

Für phänotypische Analysen der generierten HA-transgenen Tiere wurden Mäuse ab der 2. Rückkreuzungsgeneration verwendet.

2.3.4 Transfermodell von TCR-HA Zellen in Villin-HA Mäusen

Zum Aufbau eines adoptiven Transfermodells wurden Villin-HA transgene Mäuse der Linie 2 ab der 5. Rückkreuzungsgeneration als Empfängermause verwendet. Als Donormäuse wurden TCR-HA transgene Tiere geopfert (Kirberg *et al.*, 1994). Milzen und MLN der TCR-HA transgenen Tiere wurden isoliert und gepoolt, am Automacs depletiert und der Gehalt an $6.5^+ CD4^+$ TCR-HA transgenen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden $1 \cdot 10^7$ $CD4^+$ T-Zellen in 200 μ l PBS-Puffer aufgenommen und den Villin-HA Empfängertieren intravenös (i.v.) injiziert. Der Gehalt an transferierten $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen betrug ca. $2 \cdot 10^6$ $CD4^+$ 6.5^+ T-

Zellen (20%). Ein oder vier Wochen nach dem adoptiven Transfer wurden die Empfängeräuse geopfert und analysiert.

2.3.5 Autoimmune Villin-HA x TCR Modelle

Zum Aufbau der autoimmunen Villin-HA x TCR Modelle wurden Villin-HA Mäuse ab der 5. Rückkreuzungsgeneration verwendet. Dazu wurden HA-transgene Tiere der Villin-HA Linien 1 und 2 mit TCR-transgenen Tieren der Mauslinien CL4-TCR und TCR-HA verpaart (Morgan *et al.*, 1996; Kirberg *et al.*, 1994). Nicht-transgene, TCR-transgene, Villin-HA transgene und doppelt-transgene Tiere der F1-Generation wurden entsprechend den Fragestellungen mit geeigneten Methoden analysiert.

2.4 Histologie

Die Immunhistochemie wurde in enger Kooperation mit Herrn Dr. Achim Gruber an der Tierärztlichen Hochschule Hannover vorgenommen. Immunhistochemische Schnitte wurden zur Analyse transgener Mäuse durchgeführt, um die Infiltration von Lymphozyten und Entzündungsreaktionen im Darm nachzuweisen.

2.4.1 Probennahme und Schnittanfertigung

Zur immunhistochemischen Analyse wurden die Därme präpariert, in drei Teile geteilt und mit PBS-Puffer ausgespült. Die Darmstücke wurden aufgerollt und in Standardeinbettkassetten (Engelbrecht) gelegt. Über Nacht wurden diese dann in 10%igen neutral gepufferten Formalin bei RT fixiert und anschließend in Paraffin am Einbettautomaten (Shandon) eingebettet. Nach der Einbettung wurden 4µm Schnitte vom Jejunum und vom Ileum angefertigt und zur mikroskopischen Analyse mit Haematoxylin und Eosin (H & E) gefärbt.

2.4.2 Auswertung der histologischen Präparate

Zur Beurteilung der Infiltration mit Lymphozyten wurden die histologischen Schnitte am Mikroskop hinsichtlich der Anzahl infiltrierender Lymphozyten analysiert. Dazu wurde die Anzahl der Lymphozyten im LPL- und im IEL-Kompartiment bestimmt, indem mindestens acht Villi ausgezählt wurden. Die so erhaltenen Messwerte wurden

auf 100 Enterozyten hochgerechnet und hieraus der Mittelwert errechnet. Zur photographischen Dokumentation wurden Fotos angefertigt.

2.4.3 Immunhistochemie

Zum Nachweis von T-Lymphozyten wurde eine Immunhistochemie unter Benutzung eines Ratte- α -human CD3-Antikörpers (CD3-12, Serotec Ltd. Kidlington, UK) vorgenommen. Der Antikörper wurde zur Färbung 1:1.600 eingesetzt und anschließend mittels eines Avidin-Biotin-Complexes (ABC) unter Verwendung von Diaminobenzidin als Chromogen nachgewiesen. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit Haematoxylin und Eosin gegengefärbt. Zur photographischen Dokumentation wurden Fotos angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung der HA-transgenen Mauslinien

Experimentelle Tiermodelle stellen die Basis für das Verständnis der Faktoren und der genetischen Prädispositionen dar, die zu den pathophysiologischen Prozessen der CEDE führen. Zum Aufbau eines antigenspezifischen Mausmodells wurde als Modellantigen das HA-Protein gewählt, da hier die immunodominanten Epitope bekannt waren und Mauslinien mit TCR-transgenen T-Zellen gegen diese Epitope existieren (s. Kap. 1.5.1 und Kap. 1.5.3). Drei verschiedene Promotoren, der IFABP-, der FABPi- und der Villin-Promotor wurden verwendet, um eine gewebespezifische Expression des HA zu erreichen (s. Kap. 1.5.2). Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten HA-Konstrukte wurden in den Pronukleus von *in-vitro* fertilisierten Oozyten mikroinjiziert und stabil in die Keimbahnen von Mäusen integriert (Gordon und Ruddle, 1985). Da in der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) die Möglichkeiten zur Mikroinjektion der Transgene nicht bestanden, wurde die Firma Ozgene (Perth, Australien) mit diesen Arbeiten beauftragt. Zur Generierung HA-transgener Mäuse wurden die drei vollständigen HA Transgene linearisiert und von vektorieller DNA abgetrennt. Jedoch erwiesen sich anfängliche Versuche, Mikroinjektionen in die Oozyten von BALB/c-Mäusen vorzunehmen als erfolglos. Alternativ wurden die Transgene daher in die Vorkerne befruchteter (C57BL/6JxDBA/2) F1 Oozyten mikroinjiziert. Intakte Zygoten wurden in die Eileiter scheinschwangerer Ammenmäuse eingebracht und ausgetragen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit war es notwendig, die generierten HA-transgenen Mauslinien auf einen BALB/c-Hintergrund zurückzukeuzen.

3.1.1 Herstellung von IFABP-HA transgenen Mäusen

Das 4.638bp große IFABP-HA Transgen wurde in einem pGemT-Vektor (Promega) konstruiert (Abb. 3-1A), in dem zunächst ein Oligonukleotid-Linker eingebracht wurde, um die erforderlichen Schnittstellen zur Klonierung des Transgens zu erhalten. Der Reihe nach wurden dann der IFABP-Promotor (Sweetser *et al.*, 1988), die Polyadenylierungssequenz und eine humane Intronsequenz des IFABP-Gens inseriert. Über eine NheI-Schnittstelle wurde die vollständige für das HA kodierende Sequenz in den Vektor

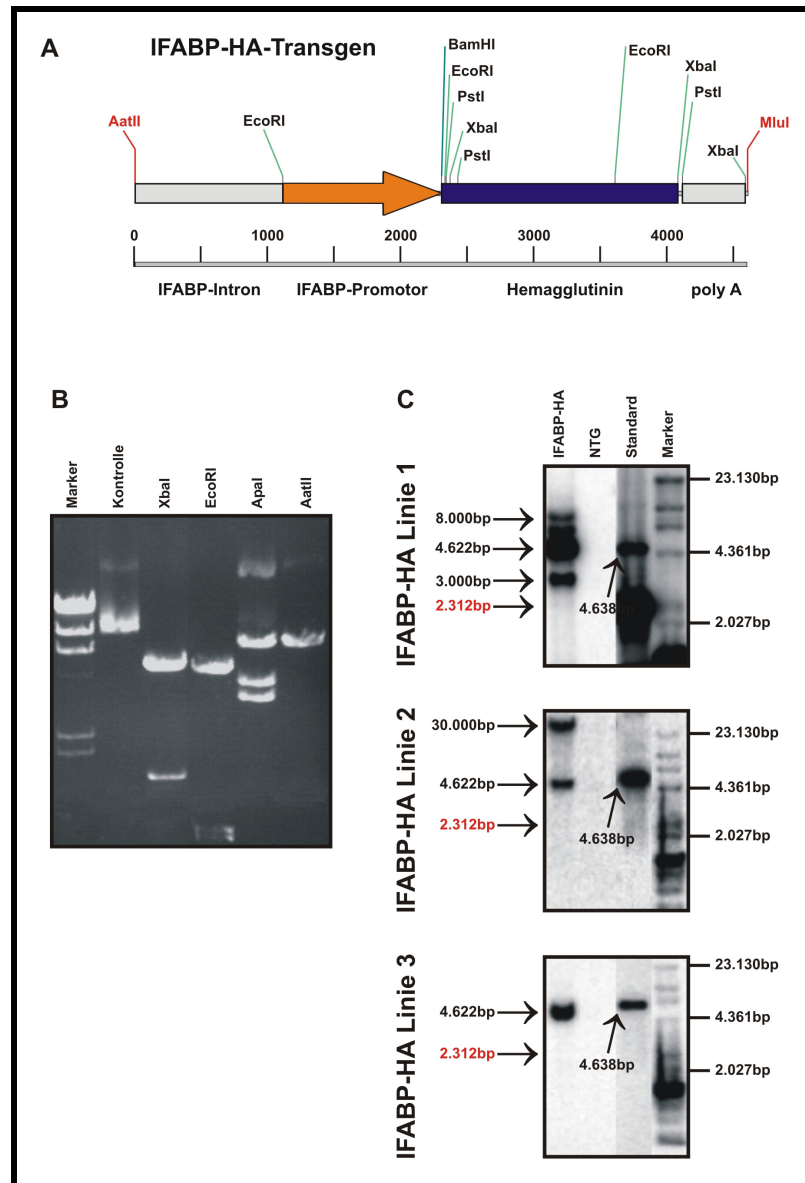


Abb. 3-1: Generierung der IFABP-HA transgenen Mäuse

A Vektorkonstrukt für die Mikroinjektion. Als Vektor zur Klonierung wurde ein pGem-T-Vektor verwendet. Zunächst wurde ein zur Konstruktion benötigter Linker in die „Multi-Cloning-Site“ (MCS) des Vektors eingebracht. Der Reihe nach wurden dann der IFABP-Promotor, die Polyadenylierungssequenz und eine humane Intronsequenz des IFABP-Gens inseriert. Anschließend wurde die kodierende Sequenz für das vollständige HA über eine NheI-Schnittstelle in den Vektor eingefügt. Zur Entfernung prokaryontischer Sequenzen wurde das Transgen mit AatII und MluI linearisiert und in den Pronukleus von *in-vitro* fertilisierten Oozyten mikroinjiziert. B Restriktionsverdau des Endkonstruktes. Das Endkonstrukt des IFABP-HA Transgens wurde mit Hilfe der Enzyme XbaI, EcoRI, ApaI und AatII restringiert und in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die DNA-Fragmente wiesen eine korrekte elektrophoretische Auftrennung auf. C Southern Blot-Analysen der drei generierten IFABP-HA Mauslinien. DNA aus Mäuseschwänzen wurde isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit BamHI verdaut und auf eine Nylon-Membran geblottet. Gezeigt werden die Hybridisierungssignale einer HA-spezifischen radioaktiv markierten ^{32}P -Sonde für ein positives und ein negatives Tier jeder Linie. Als Standard wurden 2 ng des linearisierten IFABP-HA Vektors eingesetzt.

eingefügt.¹³ Das Konstrukt wurde durch eine Restriktionsanalyse (Abb. 3-1B) und eine Sequenzierung der HA-Domäne auf seine Korrektheit überprüft. Die verwendeten Restriktionsenzyme erzeugten die erwarteten DNA-Fragmente und Fragmentgrößen und die Ergebnisse der Sequenzierung stimmten mit der Originalsequenz des HA überein. Zusätzlich wurde der IBABP-HA-Vektor mittels Calciumphosphat-Transfektion in eine humane Colocarcinom-Zelllinie (Caco-2) transfiziert, allerdings zeigte sich in durchflusszytometrischen Messungen mit HA-spezifischen Antikörpern in dieser Zelllinie keine Expression des HA-Proteins. Das Transgen wurde über die Schnittstellen AatII und MluI linearisiert, von verunreinigenden Vektorsequenzen isoliert und in die Oozyten mikroinjiziert.

Die von den Ammen ausgetragenen möglicherweise IFABP-HA transgenen Mäuse wurden mit Southern Blots unter Verwendung einer HA-spezifischen radioaktiv markierten Sonde und genomischer DNA aus Mäuseschwänzen, die mit dem Restriktionsenzym BamHI restringiert worden war, auf Transgenintegration überprüft. Insgesamt wurden fünf transgene Tiere unter 85 ausgetragenen Tieren detektiert (6%). Drei dieser „Founder-Tiere“ wurden als Begründer von IFABP-HA transgenen Mauslinien mit BALB/c-Mäusen verpaart und auf einen BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt.

Als Standard und Positivkontrolle für die Southern Blots (Abb. 3-1C) wurde ein linearisiertes IFABP-HA Transgen mit einer Masse von 2 ng verwendet. Nachkommen der drei IFABP-HA Mauslinien wiesen linientypische Hybridisierungssignale auf, die sich in der Stärke der Signale und den detektierten DNA-Fragmentgrößen widerspiegeln. IFABP-HA transgene Mauslinien zeigten anhand ihrer Hybridisierungssignale die Integration von ca. vier bis acht Transgenkopien. Die Stärke des Signals in der Linie 1 deutete auf die Integration von ca. acht Kopien hin, hingegen war dieser Wert in den IFABP-HA Linien 2 und 3 mit jeweils ca. 4 integrierten Kopien geringer. Interessanterweise wurde in allen transgenen Mauslinien ein Hybridisierungssignal mit einer Größe von ca. 4.600bp detektiert. Dies entsprach bei einem Verdau mit dem Enzym BamHI genau dem Doppelten des kleinst möglichen zu erwartenden Restriktionsfragment mit 2.312bp. Vermutlich hatten sich Transgenkopien in einer „head-to-tail“-Konfiguration zusammengelagert, so dass die Transgenkopien in einer Tandemkonfiguration integriert wurden und die eingesetzte HA-spezifische Sonde

¹³ Die kodierende Sequenz des Hemagglutinins wurde freundlicherweise von Harald von Boehmer (Harvard University, Boston) zur Verfügung gestellt.

demnach diese Tandemkopien mit der doppelten Größe erkannte. Zusätzliche sichtbare Hybridisierungssignale für die IFABP-HA Linie 1 bei ca. 6.000 und 8.000bp sind sehr wahrscheinlich auf eine unvollständige Restriktion der DNA zurückzuführen. Die in der IFABP-HA Linie 1 und 2 detektierten Fragmente bei 3.000bp und 30.000bp beinhalten vermutlich die letzte am 3'-Ende ins Genom integrierte Transgenkopie, auf die ca. 700bp bzw. 27.000bp nach dem Ende des Transgens eine BamHI-Schnittstelle im endogenen Genom der „Founder“-Maus folgte. Nicht-transgene Geschwistertiere zeigten in Southern Blots keine Hybridisierungssignale mit der HA-spezifischen Sonde.

3.1.2 Herstellung von FABPi-HA transgenen Mäusen

Das 4.789bp große FABPi-HA Transgen wurde in einem pGem5Zf-Vektor (Promega) konstruiert (Abb. 3-2A). Über eine Sall Schnittstelle im Vektor wurde der FABPi-Promotor (Green *et al.*, 1992), eine murine Intronsequenz des IFABP-Gens und ein Polyadenylierungssignal in den Vektor eingebracht.¹⁴ Die Korrektheit des Konstruktes wurde mit Restriktionsanalysen (Abb. 3-2B) und einer Sequenzierung der HA-Domäne überprüft. Auch für das FABPi-HA Konstrukt zeigte sich in durchflusszytometrischen Messungen nach einer Calciumphosphat-Transfektion keine sichtbare Expression des HA. Das Transgen wurde mit dem Restriktionsenzym Sall linearisiert, aufgereinigt und in die Oozyten mikroinjiziert.

Nachkommen der in Ammen ausgetragenen gentechnisch manipulierten Zygoten, wurden wiederum in Southern Blots auf Transgenintegration überprüft. Insgesamt wurden sieben transgene unter 167 überprüften Tieren (4,2%) detektiert. Drei dieser transgenen Tiere wurden als Foundertiere von FABPi-HA transgenen Mauslinien mit BALB/c-Mäusen verpaart. Diese Mauslinien werden in der GBF gehalten und auf einen BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt. Mit Ausnahme der FABPi-HA Transgenintegration ließ sich in transgenen Mäusen weder ein erkennbarer Phänotyp noch eine Erkrankung nachweisen.

Auch für FABPi-HA transgene Mäuse ergaben sich linienspezifische Hybridisierungssignale hinsichtlich der Signalstärken und der detektierten DNA-Fragmentgrößen (Abb. 3-2C). Als Standard für die Southern Blots von FABPi-HA transgenen Mäusen wurde ein linearisiertes FABPi-HA Transgen mit einer Masse von 2

¹⁴ Der FABPi-Promotor wurde freundlicherweise von Sylvie Robine (Institut Curie, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

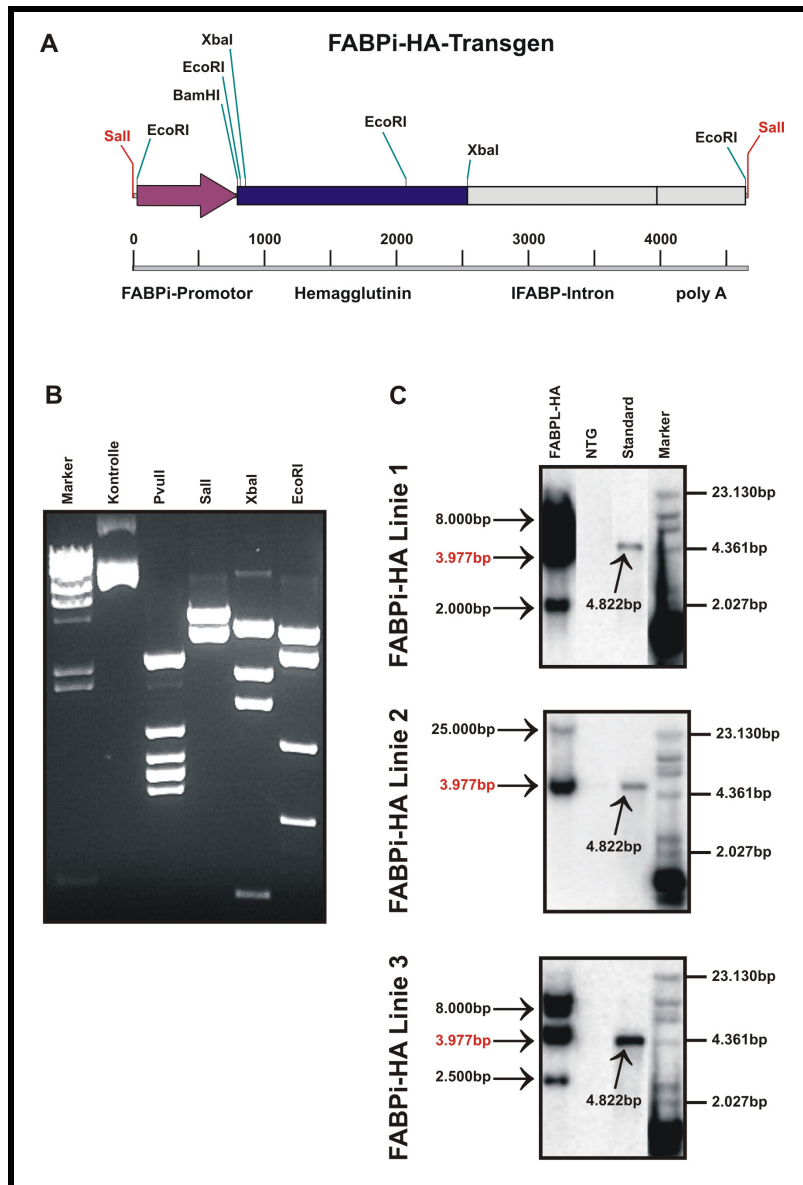


Abb. 3-2: Generierung der FABPi-HA transgenen Mäuse

A Vektorkonstrukt für die Mikroinjektion. Als Vektor zur Klonierung wurde ein pGem-5Zf-Vektor verwendet. Über eine Sall Schnittstelle im Vektor wurde der FABPi-Promotor, eine murine Intronsequenz des IFABP-Gens und ein Polyadenylierungssignal eingebracht. In einem zweiten Schritt wurde der Vektor hinter dem Promotor mit BamHI geöffnet und die vollständige cDNA, die für das Hemagglutinin kodiert, inseriert. Zur Entfernung prokaryontischer Sequenzen wurde das Transgen mit Sall linearisiert und in den Pronukleus von *in-vitro* fertilisierten Oozyten mikroinjiziert. B Restriktionsverdau des Endkonstruktes. Das Endkonstrukt des FABPi-HA Transgens wurde mit Hilfe der Enzyme PvuII, Sall, XbaI restringiert und in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die DNA-Fragmente wiesen eine korrekte elektrophoretische Auftrennung auf. C Southern Blot-Analysen der drei generierten FABPi-HA Mauslinien. DNA aus Mäuseschwänzen wurde isoliert, mit BamHI verdaut und auf eine Nylon-Membran geblottet. Gezeigt werden die Hybridisierungssignale einer HA-spezifischen radioaktiv markierten ^{32}P -Sonde für ein positives und ein negatives Tier jeder Linie. Als Standard wurden 2 ng des linearisierten FABPi-HA Vektors eingesetzt.

ng verwendet, welches in allen Experimenten nachgewiesen werden konnte. In FABPi-HA transgenen Mauslinien war eine erhöhte Anzahl integrierter Transgenkopien (fünf bis 25) gegenüber IFABP-HA und Villin-HA Mäusen zu erwarten, da dieses Konstrukt

mit Hilfe des Restriktionsenzym SalI am 5'- und am 3'-Ende linearisiert wurde. Dadurch war eine zusätzliche Aggregation der einzelnen DNA-Sequenzen aufgrund einer passenden Überlappung der überhängenden 5'- und 3'-Enden möglich. Linie 1 zeigte mit ca. 25 Kopien die höchste Anzahl integrierter Transgene. Mindestens drei DNA-Fragmente mit einer Größe von 2.000bp, 4.000bp und 8.000bp wurden von der Hybridisierungssonde in der Linie 1 erkannt. Vermutlich wurden auch hier wieder zahlreiche Transgenkopien in einer „head-to-tail“-Konfiguration ins Genom integriert, so dass die zu erwartende Mindestgröße für HA-spezifische Hybridisierungssignale sich von 3.977bp auf ca. 8000bp verdoppelte. Unklar bleibt aber, warum auch ein Hybridisierungssignal bei ca. 2.000bp detektiert wurde. Ähnliche Signale wie für die FABPi-HA Linie 1 wurden auch für die FABPi-HA Linie 3 beobachtet. Hier zeigten sich ebenfalls Hybridisierungssignale bei 4.000bp und 8.000bp, allerdings waren die Werte im Vergleich zur Linie 1 mit ca. 10-12 integrierten Kopien geringer. Auch in der Linie 3 wurde ein Hybridisierungssignal bei ca. 2.500bp detektiert, dessen Herkunft nicht geklärt werden konnte. In der Linie 2 scheinen Transgenkopien ausschließlich in einer „head-to-head“-Konfiguration ins Genom integriert worden zu sein. Hier waren zwei Signale sichtbar, ein starkes bei 3.977bp und ein schwaches bei ca. 25.000bp. Bei dem 25.000bp-Fragment handelt es sich sehr wahrscheinlich wiederum um die letzte ins Genom integrierte Transgenkopie, auf die ca. 21.000bp nach dem Ende des Transgens eine BamHI-Schnittstelle im endogenen Genom der „Founder“-Maus folgte. Vermutlich integrierten ca. fünf Transgenkopien ins Genom von FABPi-HA Mäusen der Linie 2. Nicht-transgene Geschwistertiere wiesen in Southern Blots keine Hybridisierungssignale mit der verwendeten HA-spezifischen Sonde auf.

3.1.3 Herstellung von Villin-HA transgenen Mäusen

Das 10.867bp große Villin-HA Transgen wurde in einem pBluescript II KS +/- Vektor (Stratagene) konstruiert (Abb. 3-3). Dieser Vektor enthielt bereits den Villin-Promotor (Pinto *et al.*, 1999), eine 9kB große Intronsequenz des Villin-Gens, sowie eine Polyadenylierungssequenz.¹⁵ Die kodierende Sequenz des Hemagglutinins wurde mittels HA-spezifischer Primer unter Verwendung einer PFU-Polymerase amplifiziert und über eine AatII-Schnittstelle „blunt“ und im Leseraster in das Startkodon des

¹⁵ Der Villin-Promotor wurde ebenfalls von Sylvie Robine (Institut Curie, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Vektors inseriert. In Restriktionsanalysen ergaben sich die zu erwarteten DNA-Fragmente und Fragmentgrößen, ebenfalls lieferte die Sequenzierung des Transgens eine vollständige Übereinstimmung mit der Originalsequenz des HA. Darüber hinaus konnte die Funktionsfähigkeit des Villin-HA Transgens, im Gegensatz zu den beiden anderen konstruierten HA Transgenen, durch eine Calciumphosphat-Transfektion in die Zelllinie Caco-2 nachgewiesen werden. In durchflusszytometrischen Messungen mit HA-spezifischen Antikörpern zeigten ca. 2% der Zellen eine membranständige Expression des HA (Daten nicht gezeigt). Das Transgen wurde mit ClaI und SacII linearisiert und in den Pronukleus von *in-vitro* fertilisierten Oozyten mikroinjiziert.

Mit Southern Blots wurden potentielle Villin-HA transgene Mäuse auf ihre Transgenintegration untersucht (Abb. 3-3C). Als Standard und Positivkontrolle für die Blots wurde ein linearisiertes Villin-HA Transgen mit einer Masse von 2 ng verwendet. Insgesamt wurden drei Villin-HA transgene „Founder-Tiere“ unter 60 in Ammen ausgetragenen Tieren detektiert (5%). Diese drei Tiere wurden als Begründer von Mauslinien mit BALB/c-Mäusen verpaart. Alle drei generierten Mauslinien werden in der GBF gehalten und auf einen BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt. Auch in Villin-HA transgenen Mäuse führte die Villin-HA Transgenintegration weder zu einem nachweisbaren Phänotyp noch zu einer Erkrankung (Kolitis) in transgenen Individuen.

Die drei Mauslinien wiesen charakteristische Hybridisierungssignale bezüglich der Signalstärken und detektierten DNA-Fragmentgrößen auf. Im Vergleich zu den anderen HA-transgenen Mauslinien scheinen in Villin-HA transgenen Mauslinien nur wenige Kopien des Transgens ins Genom der Mäuse integriert worden zu sein, worauf die relativ schwachen Hybridisierungssignale der eingesetzten Sonde im Vergleich zum verwendeten Standard hinweisen. In Anbetracht der Größe des Transgens war allerdings zu erwarten, dass nur wenige Kopien des Transgens ins Genom integriert werden würden. Die Signale der Linien 1 und 2 verhielten sich bezüglich ihrer Signalstärke zum aufgetragenen Standard ähnlich und ließen auf die Integration eines einzelnen Transgens schließen, die Villin-HA transgene Linie 3 zeigte hingegen ein stärkeres Signal als die beiden ersten Mauslinien, so dass in dieser Linie ca. vier Transgenkopien ins Genom integriert wurden. In der Villin-HA Linie 1 detektierte die HA-spezifische Sonde ein DNA-Fragment mit einer Größe von 6.000bp, in den Linien 2 und 3 jeweils ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 12.000bp. Nicht-transgene Geschwistertiere wiesen in Southern Blots keine Hybridisierungssignale mit der HA-spezifischen Sonde auf.

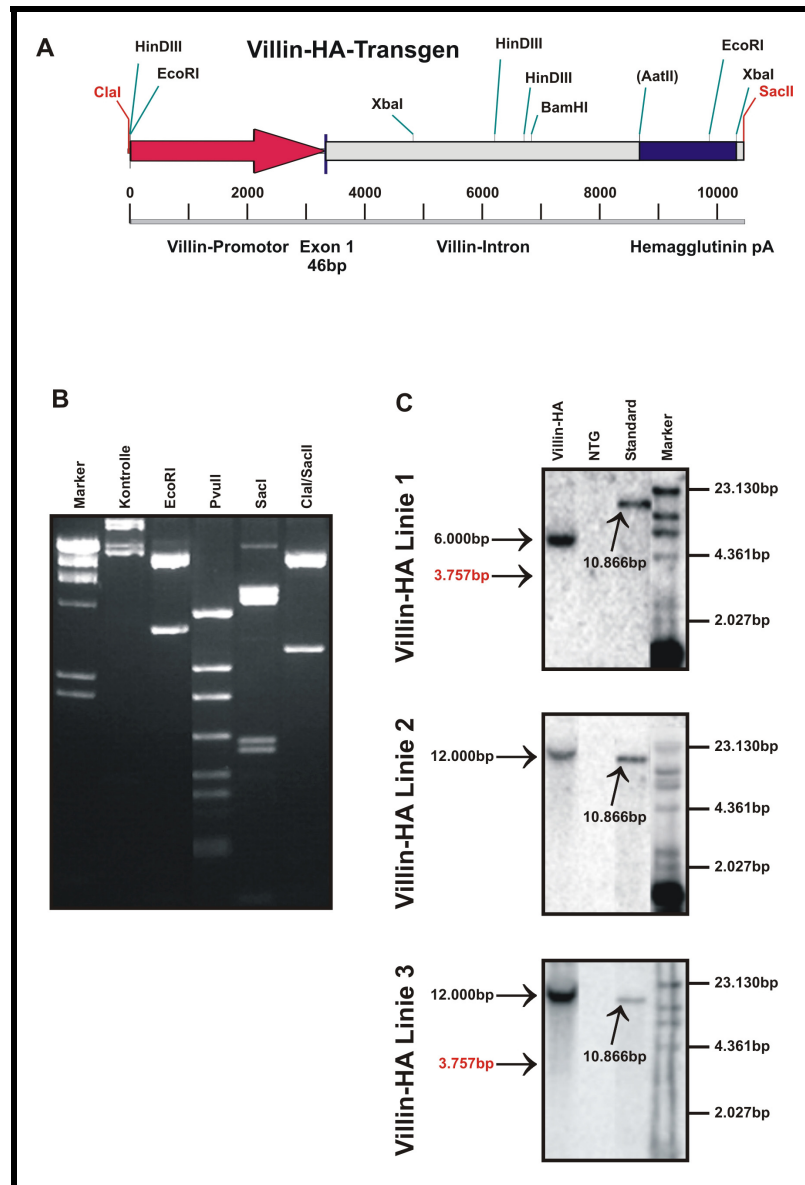


Abb. 3-3: Generierung der Villin-HA transgenen Mäuse

A Vektorkonstrukt für die Mikroinjektion. Als Vektor zur Klonierung wurde ein pBluescript II KS +/- Vektor verwendet. Dieser Vektor enthielt bereits den Villin-Promotor, eine 9kB große Intronsequenz des Villin-Gens, sowie eine Polyadenylierungssequenz und wurde freundlicherweise von Sylvie Robine (Institut Curie, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die kodierende Sequenz des Hemagglutinins wurde mittels HA-spezifischer Primer unter Verwendung einer PFU-Polymerase amplifiziert und über eine AatII-Schnittstelle „blunt“ und in frame in das Startkodon des Vektors inseriert. Zur Entfernung prokaryontischer Sequenzen wurde das Transgen mit Clal und SacII linearisiert und in den Pronukleus von *in-vitro* fertilisierten Oozyten mikroinjiziert. B Restriktionsverdau des Endkonstruktes. Das Endkonstrukt des Villin-HA Transgens wurde mit Hilfe der Enzyme EcoRI, PvuII, SacI und Clal/SacII restringiert und in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die DNA-Fragmente wiesen eine korrekte elektrophoretische Auftrennung auf. C Southern Blot-Analysen der drei generierten Villin-HA Mauslinien. DNA aus Mäuseschwänzen wurde isoliert, mit BamHI verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran gebロットet. Gezeigt werden die Hybridisierungssignale einer HA-spezifischen radioaktiv markierten ^{32}P -Sonde für ein positives und ein negatives Tier jeder Linie. Als Standard wurden 2 ng des linearisierten Villin-HA-Vektors eingesetzt.

3.1.4 Detektion TCR- und HA-transgener Mäuse

TCR transgene Mäuse der TCR transgenen Mauslinien CL4-TCR und TCR-HA wurden mit BALB/c-Mäusen verpaart, um Mäuse für Tierexperimente zu generieren. Der Genotyp transgener Mäuse, welche aus solchen Verpaarungen hervorgingen, konnte durch TCR-spezifische PCR-Analysen bestimmt werden (Abb. 3-4A). Dazu wurden entweder CL4-TCR- (oben) oder TCR-HA-spezifische Primerpaare (unten) verwendet, um das entsprechende Transgen in isolierter genomischer DNA aus Mäuseschwänzen nachzuweisen. Beide Primerpaare waren in der Lage, transgene (links) von nicht-transgenen Geschwistertieren (rechts) zu unterscheiden. In CL4-TCR transgenen Mäusen lieferte das verwendete CL4-TCR Primerpaar ein 450bp großes spezifisches DNA-Fragment, in TCR-HA transgenen Mäusen lieferte das verwendete TCR-HA Primerpaar (oben) ein 500bp großes spezifisches DNA-Fragment.

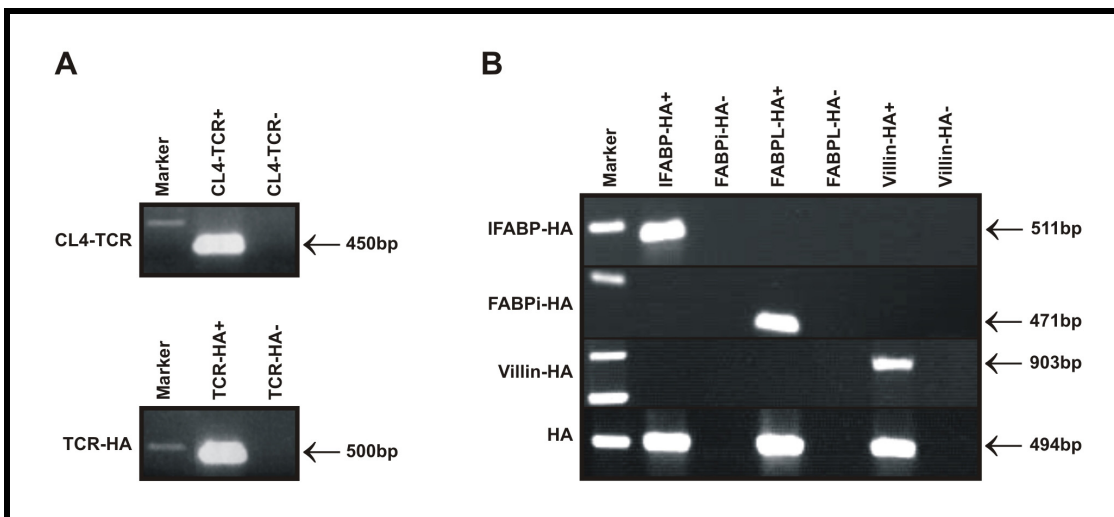


Abb. 3-4: Detektion transgener Mäuse mit spezifischen Primern

A Nachweis CL4-TCR- und TCR-HA transgener Mäuse. Der Nachweis TCR-transgener Mäuse wurde mit Hilfe von PCR-Amplifikationen unter Verwendung von TCR-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. In CL4-TCR transgenen Mäusen konnte ein 450bp großes DNA-Fragment und in TCR-HA transgenen Mäusen ein 500bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden. Gezeigt werden jeweils ein CL4-TCR positives und ein nicht-transgenes (NTG) Geschwistertier. B Nachweis HA-transgener Mäuse. Die verschiedenen HA-transgenen Mauslinien konnten mit Hilfe von Promotor-spezifischen Amplifikationen (IFABP-HA, FABPi-HA und Villin-HA) nachgewiesen werden, upstream- und downstream-Primer wurden dabei so gewählt, dass sie in der Promotor- bzw. in der HA-Region hybridisierten. Zusätzlich wurde auch ein universelles HA-Primerpaar (HA) verwendet, bei dem beide Primer in der HA-Region hybridisierten und somit zum Nachweis aller HA-transgener Tiere eingesetzt werden konnte. Gezeigt werden jeweils ein positives und ein negatives Geschwistertier der drei generierten HA-transgenen Linien.

Ebenso mussten HA-transgene Mäuse der verschiedenen generierten Mauslinien, die aus Verpaarungen hervorgingen, detektiert werden. Dazu wurden ebenfalls PCR-Analysen mit genomischer DNA aus Mäuseschwänzen durchgeführt und spezifische Primer-Paare etabliert. Abb. 3-4B soll in einem 1%igen Agarosegel die Spezifitäten der etablierten Primer belegen, die zum Nachweis der Transgenität von HA-transgenen Individuen verwendet wurden. Von links nach rechts sind transgene und nicht-transgene Geschwistertiere der drei verschiedenen HA-transgenen Linien dargestellt. Von oben nach unten wurden IFABP-HA-, FABPi-HA- und Villin-HA-spezifische Primer zum Nachweis der Transgenität eingesetzt. Bei diesen Primerpaaren war der „upstream“-Primer so gewählt worden, dass er in der transgenspezifischen Promotorregion hybridisierte, der „downstream“-Primer hybridisierte hingegen in der kodierenden Sequenz des HA-Proteins. Die Verteilung der Amplifikationssignale belegt, dass die verwendeten Primerpaare transgenspezifisch waren und keine Kreuzreaktivitäten bei den unterschiedlichen HA-Transgenen vorlagen. In der vierten unteren Reihe wurde hingegen ein universelles HA-Primerpaar verwendet, um HA-transgene Individuen unabhängig vom verwendeten Promotor nachweisen zu können. Hier zeigten alle HA-transgene Individuen ein positives Signal.

3.1.5 RNA Expressionsanalysen in HA-transgenen Mauslinien

3.1.5.1 HA mRNA Expression in HA-transgenen Mauslinien

Um die gewebespezifische Expression von HA mRNA in den HA-transgenen Mauslinien zu untersuchen, wurde RNA aus dem Epithel verschiedener Regionen des Darms und aus anderen Organen von HA-transgenen und nicht-transgenen Geschwistertieren isoliert, verunreinigende DNA wurde mit Hilfe von RNase-freier DNase abgedaut und gleiche Mengen an RNA wurden zu cDNA umgeschrieben. Jeweils 40ng der cDNA-Proben wurden für eine semiquantitative Analyse der mRNA Expression eingesetzt und mit Hilfe von HA- und RPS9-(Ribosomales Protein S9)-spezifischen Primern für 30 Zyklen amplifiziert. DNA-Extraktionen aus Mäuseschwänzen von transgenen und nicht-transgenen Tieren dienten als Positiv- und Negativkontrollen. Die mittels PCR amplifizierten Proben wurden anschließend in Agarosegelen auf die Expression von HA und RPS9 mRNA analysiert. Abb. 3-5A zeigt die HA mRNA Expression der einzelnen Gewebe der verschiedenen HA-transgenen Linien, Abb. 3-5B zeigt exemplarisch für alle HA-transgenen Mauslinien die RPS9

mRNA Expression des „house-keeping“-Gens für IFABP-HA transgene Mäuse. Für alle generierten cDNA-Proben waren RPS9-Signale messbar, was eine erfolgreiche cDNA-Synthese der Proben bestätigte.

IFABP-HA transgene Mauslinien (Abb. 3-5A, oberes Diagramm) zeigten weitgehend eine Expression von HA mRNA im Dünndarm. Die IFABP-HA Mauslinien 2 und 3 wiesen ein Expressionsmaximum für HA mRNA im Jejunum und im Ileum der generierten Proben auf, die IFABP-HA transgene Linie 1 ein Maximum für die HA Expression im Ileum. Im Vergleich zum gemessenen Signal der Linie 2 waren die Amplifikationssignale der Linien 1 und 3 stärker. Zusätzlich waren in Linie 1 auch schwache Amplifikationssignale im Thymus und in der Milz sichtbar. Nicht-transgene IFABP-HA Geschwistertiere zeigten hingegen keine Expression von HA mRNA.

FABPi-HA transgene Mauslinien (Abb. 3-5A, mittleres Diagramm) zeigten eine unspezifischere Expression von HA mRNA, da auch in vielen anderen Organen Amplifikationssignale sichtbar waren. Die stärksten Amplifikationssignale waren in der Linie 1 sichtbar, gefolgt von der Linie 3. Am schwächsten waren die gemessenen Signale in der Linie 2. Übereinstimmend zeigten aber alle drei Linien eine starke HA mRNA Expression im Duodenum, wobei die Linien 1 und 3 ebenfalls starke Signale im Caecum und im Colon aufwiesen. Nur für Linie 3 war ein Amplifikationssignal im Ileum sichtbar, für das Jejunum waren in allen drei Mauslinien nur schwache oder gar keine Amplifikationssignale messbar. Neben dem Darm zeigten auch andere Organe in FABPi-HA transgenen Mäusen eine signifikante HA mRNA Expression. So waren starke Amplifikationssignale für die HA mRNA Expression im Thymus der Linien 1 und 3, nicht aber der Linie 2 sichtbar. Für die Linie 1 waren auch Signale im Herzen und in der Niere messbar. Darüber hinaus waren in allen FABPi-HA transgenen Mauslinien weitere schwächere Amplifikationssignale in mehreren Organen sichtbar. Nicht-transgene Geschwistertiere zeigten keine messbare HA mRNA Expression.

Villin-HA transgene Mauslinien (Abb. 3-5A, unteres Diagramm) zeigten durchgehend starke Amplifikationssignale im Bereich des gesamten Darmepithels. Mit 30 Amplifikationszyklen konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Vergleiches der Expressionsstärken der drei generierten Villin-HA Mauslinien festgestellt werden, jedoch zeigten sich bei 25 Amplifikationszyklen (Daten nicht gezeigt) stärkere Signale für die Linie 3 im Vergleich zu den anderen. Neben den messbaren Signalen im Darm waren auch schwache Amplifikationssignale in mehreren Geweben der Linie 1 sowie in

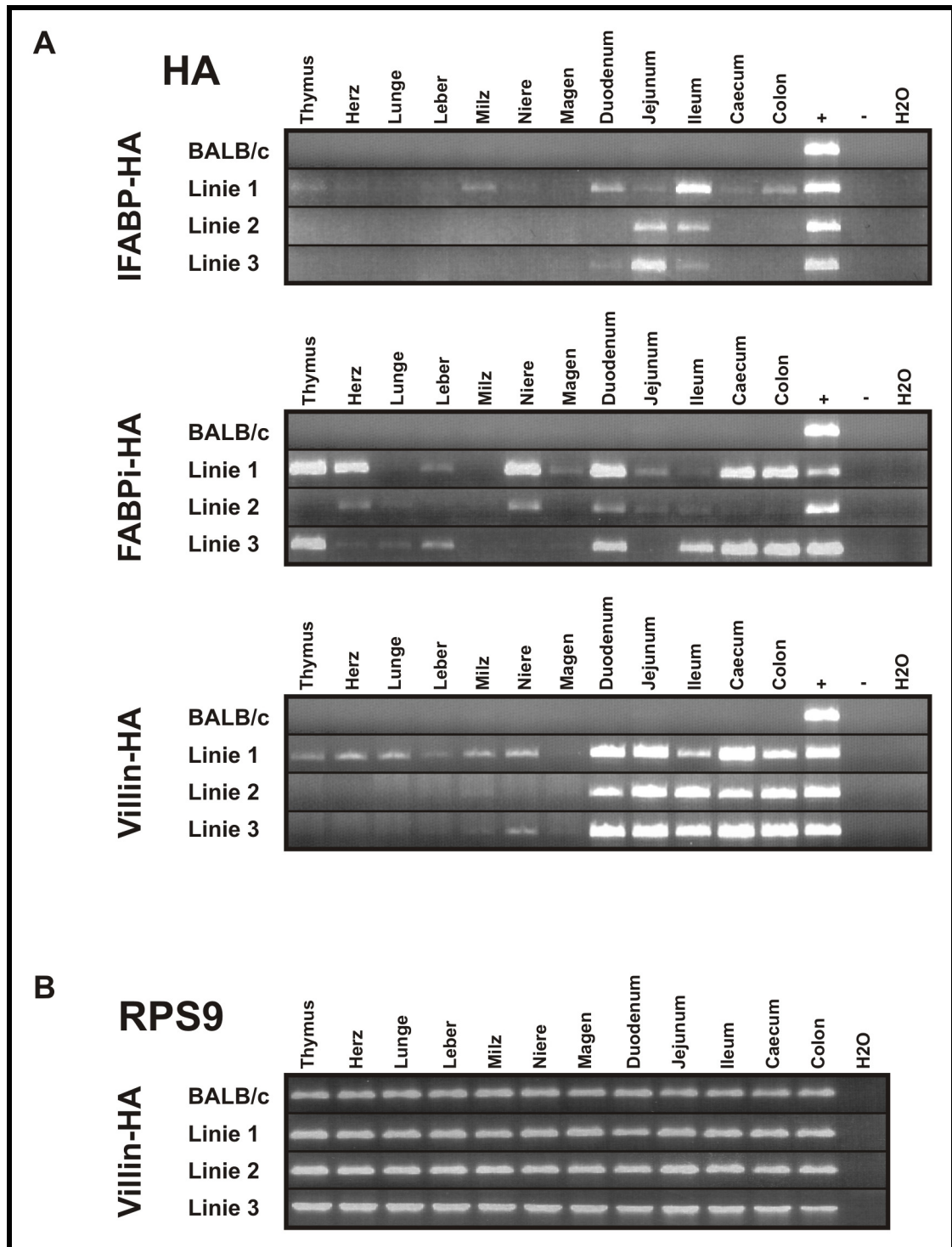


Abb. 3-5: RNA-Expression in HA-transgenen Mauslinien

RNA wurde aus den angegebenen Geweben von HA-transgenen Mauslinien und Kontrolltieren isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Jeweils 40ng cDNA wurden für eine semiquantitative PCR Analyse der mRNA Expression eingesetzt und mit HA-spezifischen Primern für 30 Zyklen amplifiziert. DNA-Extraktionen aus transgenen und nicht-transgenen Mäusen dienten als Positiv- und Negativkontrollen. Die Expression von HA mRNA in den verschiedenen Probenansätzen wurde in Agarosegelen nachgewiesen. A HA mRNA Expression. B RPS9 mRNA Expression. Zum Nachweis eines „house-keeping“-Gens wurden die Proben parallel mit RPS9-spezifischen Primern amplifiziert. In B werden exemplarisch die Ergebnisse für die RPS9-Expression der IFABP-HA Mäuse gezeigt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Daten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

der Niere der Linie 3 sichtbar. Nicht-transgene Geschwistertiere zeigten wiederum keine nachweisbare HA mRNA Expression. Da Villin-HA transgene Mäuse eine exklusive Expression im Darm aufwiesen und die Rückkreuzungen auf den genetischen BALB/c-Hintergrund am weitesten fortgeschritten waren, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich mit diesen Mäusen weitergearbeitet.

3.1.5.2 Expression des HA-Proteins in Villin-HA transgenen Mäusen

Um genauere Erkenntnisse über die Expression des HA in transgenen Villin-HA Mäusen zu gewinnen, wurden quantitative Real Time PCRs durchgeführt. In diesen Experimenten wurden die relativen Expressionen von HA mRNA im Thymus, im Jejunum und im Colon der drei generierten transgenen Mauslinien miteinander verglichen (Abb. 3-6A). Da die gemessene HA mRNA Expression im Thymus von Villin-HA Mäusen der Linie 3 am geringsten war, wurde dieser Wert gleich 1 und die anderen Messwerte ins relative Verhältnis zu diesem gesetzt. Die Daten aller drei Mauslinien zeigen übereinstimmend, dass die HA mRNA-Expression im Jejunum gegenüber dem Colon um einen Faktor von drei bis fünf erhöht war. Im Vergleich zu den hohen Expressionswerten von Jejunum und Colon waren die gemessenen Konzentrationen an HA mRNA im Thymus deutlich niedriger. Die höchsten Werte für die relative Expression wurden in der Linie 3 für das Jejunum mit ca. 12.000 bis 15.000 Einheiten gemessen. Im Vergleich dazu waren die Werte für das Jejunum der Linien 1 und 2 mit ca. 2.000 und 2.300 Einheiten um den Faktor 6 verringert. Entsprechend war auch die HA mRNA Expression im Colon der Villin-HA Mauslinie 3 mit ca. 3.000 Einheiten gegenüber ca. 500 Einheiten der Linie 1 und 600 Einheiten der Linie 2 um einen Faktor von 5 erhöht. Bei der HA mRNA Expression im Thymus ließ sich dieser Trend nicht bestätigen. Während im Thymus von transgenen Villin-HA Mäusen der Linie 2 und 3 nur sehr niedrige Werte messbar waren, zeigten Mäuse der Linie 1 eine 10-fach höhere Expression.

Zum Nachweis der HA-Protein Expression wurden Western Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 3-6B). Der Antikörper erkannte in den transgenen Villin-HA Mäusen, nicht aber in nicht-transgenen Geschwistertieren, ein Protein mit einer Größe von ca. 55kD. Als Positivkontrolle wurde ein HA-exprimierender *E. coli*-Stamm benutzt. Auch hier zeigte die Linie 3 die im Vergleich zu den anderen Linien stärkste HA-Expression und bestätigte somit die mit der quantitativen Real Time PCR

gemessenen Daten. Im Vergleich zur Linie 1 waren die gemessenen Signale für die Linie 2 schwächer, und für die Linie 1 sogar stark verringert.

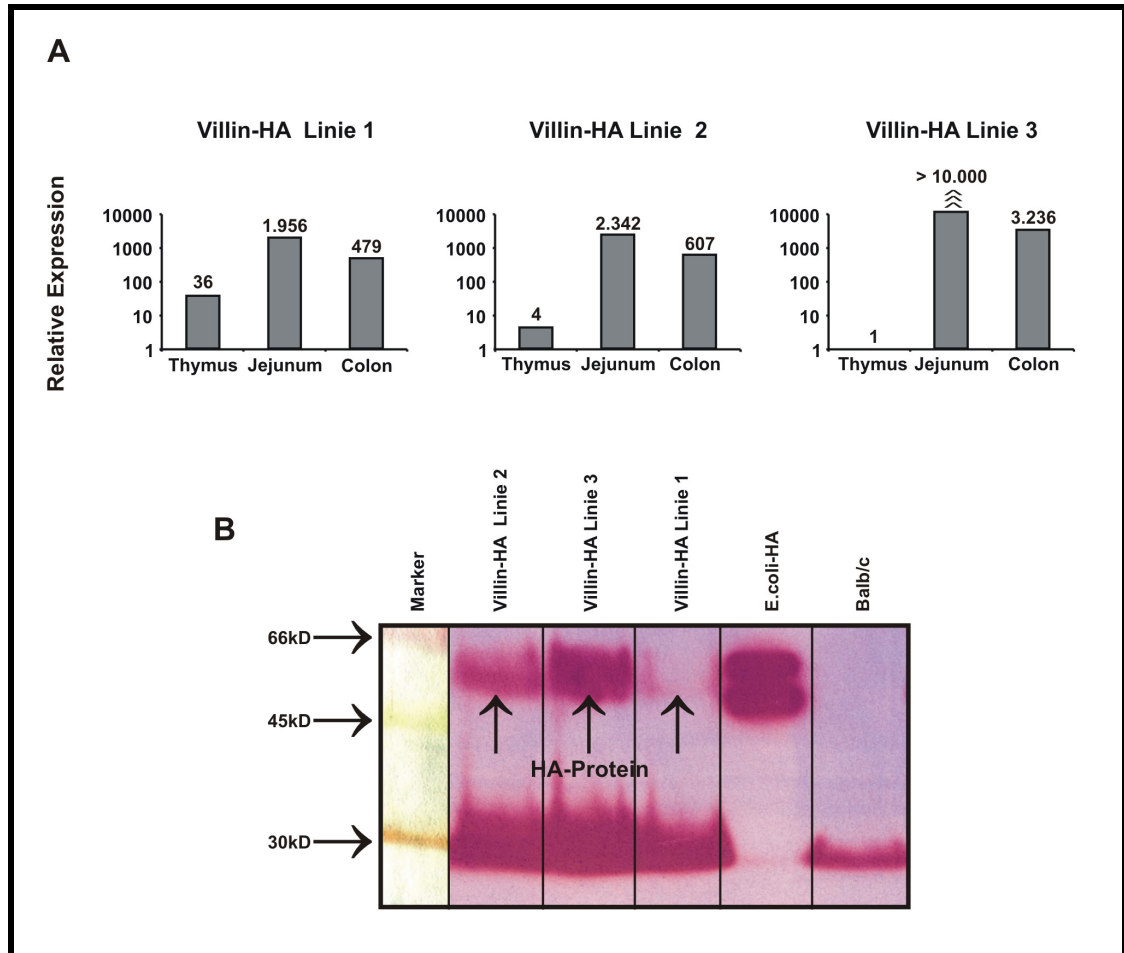


Abb. 3-6: HA Expression in Villin-HA transgenen Mauslinien

A Quantitative HA mRNA Expression der indizierten Organe aus Villin-HA transgenen Mäusen. 20ng cDNA der entsprechenden Proben wurde für die quantitative Real Time PCR mit 40 Amplifikationszyklen eingesetzt. Die relativen Werte für die HA-Expression für Jejunum und Kolon wurden mit der HA-Expression des Thymus verglichen. Der Wert für die niedrigste Expression ergab sich für den Thymus der Villin-HA Linie 3 und wurde gleich 1 gesetzt, die anderen Werte wurden in ihrem relativen Verhältnis zu diesem Wert angegeben. In nicht-transgenen Geschwistertieren konnte keine HA mRNA-Expression festgestellt werden. Die verwendeten cDNAs wurden über eine gleichzeitige Messung des „house-keeping“-Gens RPS9 nivelliert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen. B HA Protein-Expression im Western Blot. Intestinale Epithelzellen von Villin-HA transgenen und BALB/c-Kontrollmäusen wurden vom Darm abgeschabt, geerntet und lysiert. Nach einer SDS Page Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nylonmembran gebロットet und mit dem HA-spezifischen Antikörper CMI 1.2 inkubiert. Zur Detektion von luminiszenten Signale wurden die Membranen mit einem sekundären luminiszenten Antikörper inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat HA-exprimierender *E. coli* verwendet. In Villin-HA transgenen Mäusen detektierte der Antikörper ein spezifisches Fragment mit einer Größe von ca. 60kD. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

3.2 Transfer-Modell von 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in Villin-HA Mäuse

Mit dem T-Zell-Transfer von 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen aus TCR-HA Mäusen in Villin-HA Mäuse sollte untersucht werden, ob die transferierten transgenen T-Zellen ebenfalls in der Lage sind, eine antigenspezifische Kolitis in den Mäusen auszulösen. Abb. 3-8A zeigt den schematischen Versuchsaufbau für Transferexperimente. Für Transferexperimente wurden $1 \cdot 10^7$ $CD4^+$ T-Zellen entweder in Villin-HA Mäuse der Linie 2 oder in nicht-transgene Geschwistertiere transferiert. Dazu wurden T-Zellen aus den MLN und den Milzen TCR-HA transgener Mäuse isoliert und $CD8^+$ T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen und Erythrozyten mit Hilfe eines $CD4^+$ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) depletiert. Parallel durchgeführte durchflusszytometrische Analysen erlaubten es, den Anteil transferierter 6.5^+ $CD4^+$ transgener T-Zellen zu bestimmen, der bei allen Experimenten zwischen 25 und 30% lag. Eine oder vier Wochen nach dem erfolgten Transfer wurde der Gehalt an 6.5^+ $CD4^+$ transgenen T-Zellen in den MLN und in den Milzen von Empfänger-mäusen und deren Expression von Aktivierungsmarkern durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3-7 und Abb. 3-8). Ebenso wurde in histologischen Analysen die Infiltration des Darms mit Lymphozyten untersucht (Abb. 3-9). Zum Abschluss wurden in einer weiteren Versuchsreihe CFSE-markierte 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen transferiert, um Aufschluss über das Proliferationsverhalten der Zellen in den Empfänger-mäusen zu erhalten (Abb. 3-10). Für alle Transferexperimente wurden Villin-HA Mäuse der Linie 2 und deren nicht-transgene Geschwistertiere als Empfänger-mäuse genutzt, die Mauslinie war zuvor für mindestens 5 Generationen auf einen BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt worden.

3.2.1 Adoptiv transferierte 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in MLN und Milz von Empfänger-mäusen

Abb. 3-7 zeigt den Gehalt an 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in den MLN (links) und in den Milzen (rechts) 7 und 28 Tage nach erfolgtem Transfer in Villin-HA-positiven (\blacktriangle) und Villin-HA-negativen Geschwistertieren (\blacksquare). Der Gehalt an transgenen T-Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Nach 7 Tagen waren die Zellzahlen transgener T-Zellen in Villin-HA Mäusen nur in den MLN erhöht (Abb. 3-7, links). Der Anteil an 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen betrug im Durchschnitt 1,0% in Villin-HA transgenen Mäusen im Vergleich zu

0,5% bei nicht-transgenen Geschwistertieren und war damit um einen Faktor von zwei erhöht. Nach 28 Tagen hatte sich die Anzahl messbarer transgener T-Zellen auf 0,4% und 0,1% in den MLN von Villin-HA Mäusen und Kontrollmäusen verringert. In der Milz (Abb. 3-7, rechts) waren hingegen auch nach 7 Tagen keine Unterschiede zwischen Villin-HA Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren messbar, hier betrug die Anzahl transgener T-Zellen sowohl in Villin-HA Mäusen als auch in Kontrollmäusen ca. 0.4%. Nach 28 Tagen verringerte sich dieser Anteil in beiden Mausgruppen auf unter 0.2%.

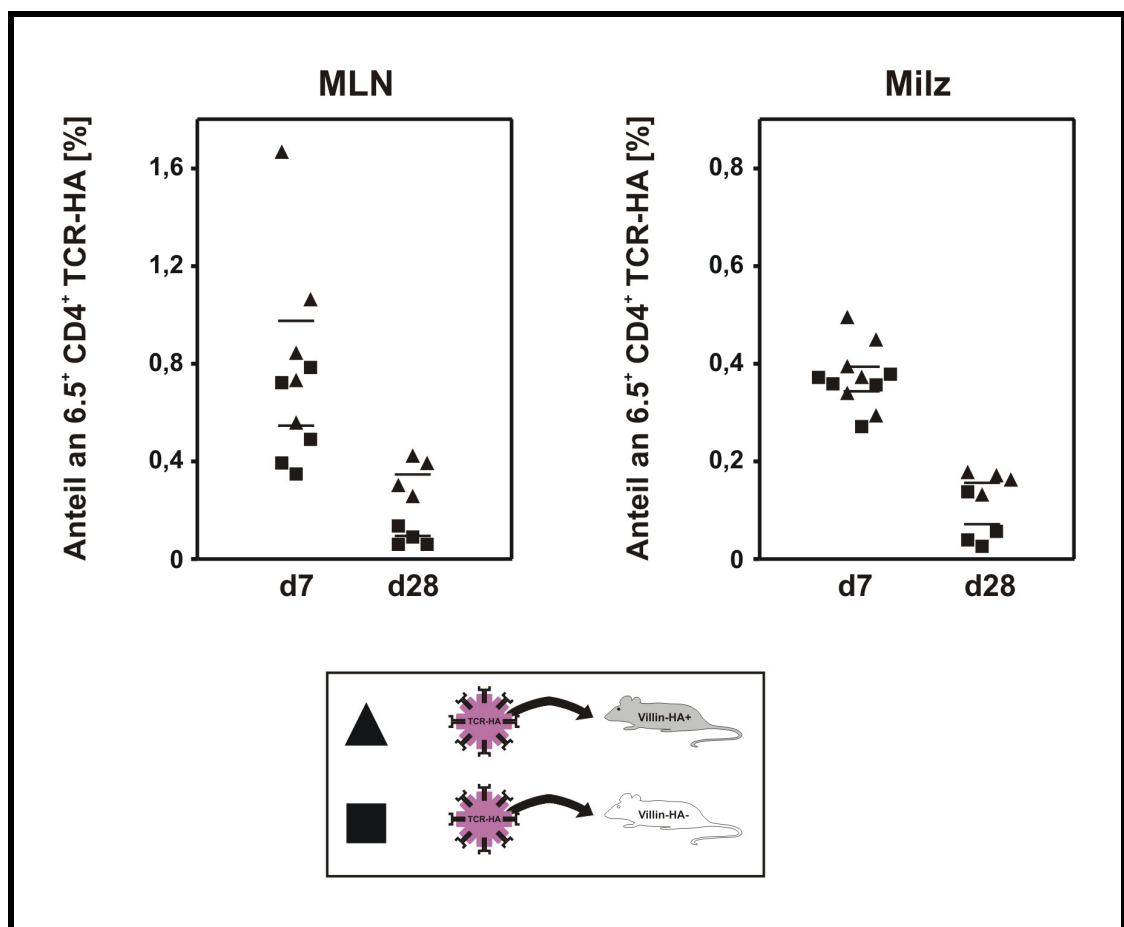


Abb. 3-7: Wiederauffindungsrate transferierter 6.5 CD4 T-Zellen

T-Zellen aus Milz und MLN von TCR-HA Mäusen wurden gepoolt, mit Hilfe von Antikörpergekoppelten Mikrosphären angereichert und 2.5 bis $3.0 \cdot 10^6$ 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvenen von Villin-HA-positiven (▲) und Villin-HA-negativen Geschwistertieren (■) transferiert. 7 und 28 Tage nach dem adoptiven Transfer wurden die Empfängermause geopfert und der Anteil an 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in den MLN und den Milzen an der Gesamtymphozytenpopulation im Durchflusszytometer bestimmt. Eine Experimentgruppe bestand aus 4 bis 6 Mäusen. Die Balken stellen die Mittelwerte der Anteile an 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen dar, die sich aus den Einzelmessungen ergaben.

3.2.2 Spezifische Aktivierung adoptiv transferierter 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in Empfängermäusen

Des weiteren wurde der Aktivierungszustand transferierter transgener T-Zellen mit Hilfe von Antikörpern durchflusszytometrisch gemessen. Abb. 3-8 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen in den MLN. In Abb. 3-8B-D wird die Expression der Aktivierungsmarker CD25 (IL-2-Rezeptor), CD62L (L-Selektin) und CD69 (frühes Aktivierungsantigen) einer nicht-transgenen Maus nach 7 Tagen (B), einer Villin-HA transgenen Maus nach 7 Tagen (C) und einer Villin-HA transgenen Maus nach 28 Tagen (D) dargestellt. Neben 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen (rechte Spalte) wurden auch 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen (linke Spalte) analysiert. Der Transfer in nicht-transgenen Geschwistertieren (Abb. 3-8B) führte zu keiner nachweisbaren Aktivierung von 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen. 11% der 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen exprimierten die Oberflächenantigene CD25 und CD69 im Vergleich zu 10% und 13% der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen. Auch bezüglich der CD62L-Expression waren keine Unterschiede messbar.

Im Gegensatz dazu wurden 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen aktiviert, die 7 Tage nach dem Transfer aus Villin-HA Empfängermäusen isoliert worden waren, 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen aus den gleichen Mäusen zeigten hingegen keine solche Aktivierung (Abb. 3-8C). So exprimierten 27% der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen das Oberflächenantigen CD25 im Vergleich zu 14% der nicht-transgenen T-Zellen. Beim Aktivierungsmarker CD69 war dieses Verhältnis noch ausgeprägter, hier zeigten 65% der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen eine Expression des Markers, aber nur 11% der Kontrollzellen. Gleichmaßen exprimierten nur noch 34% der Zellen L-Selektin im Vergleich zu 77% der Kontrollzellen. Folglich regulierten 66% der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen die Expression von CD62L herunter, was mit der Zahl der CD69-positiven T-Zellen übereinstimmte.

Auch nach 28 Tagen war die Aktivierung der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in Villin-HA Mäusen noch nachweisbar (Abb. 3-8D), obwohl die Anzahl der in den MLN nachweisbaren transgenen T-Zellen in den Empfängermäusen stark abgenommen hatte (s. oben). Die ermittelten Prozentzahlen an CD25- und CD69-positiven 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen war mit 24% und 63% nahezu identisch mit den nach 7 Tagen gemessenen Werten. Nur der Anteil CD62L-negativer T-Zellen hatte sich weiter erhöht und betrug jetzt 75%. 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen zeigten hingegen keine Aktivierung, da die Prozentzahlen aktivierter T-Zellen in dieser Subpopulation mit denen aus nicht-transgenen Empfängermäusen gleich waren.

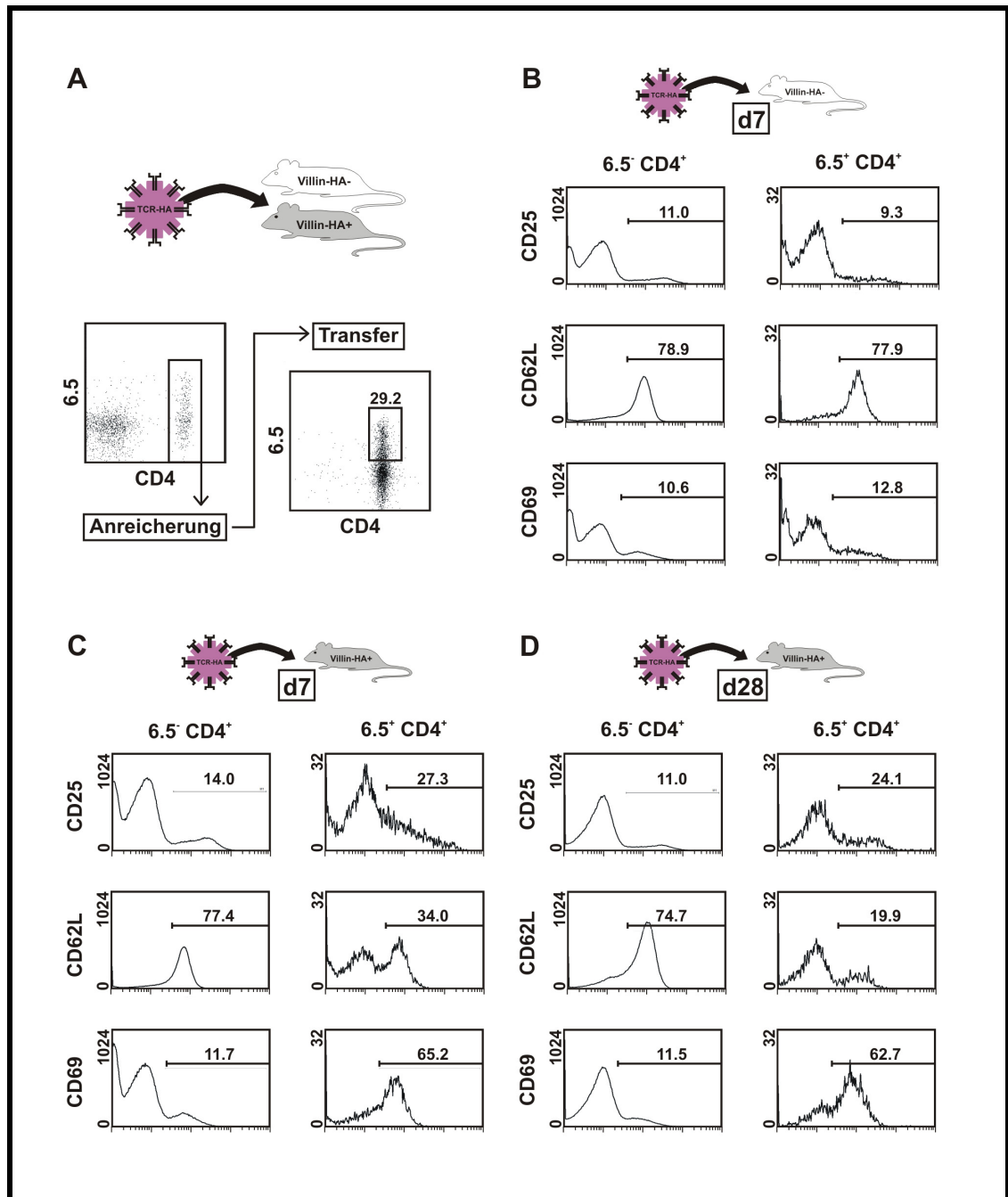


Abb. 3-8: Aktivierung von 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in Villin-HA Mäusen

A Versuchsschema. T-Zellen aus MLN und Milzen von TCR-HA Mäusen wurden isoliert und gepoolt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit Antikörper-gekoppelten Mikrosphären angereichert und die Expression des transgenen TCR (6.5) in der angereicherten CD4⁺ T-Zellpopulation im Durchflusszytometer bestimmt. Der Anteil 6.5⁺ T-Zellen betrug für alle Experimente 25-30%. Jeweils $1 \cdot 10^7$ angereicherte CD4⁺ T-Zellen, entsprechend 2.5 bis $3.0 \cdot 10^6$ 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen, wurden intravenös in die Schwanzvenen von Villin-HA-positiven (grau) und Villin-HA-negativen Geschwistertieren (weiß) injiziert. B-D Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD62L und CD69 auf 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen. 7 oder 28 Tage nach dem adoptiven Transfer wurden die Empfängermause geopfert und MLN Lymphozyten isoliert. Die 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen (linke Spalte) und 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen (rechte Spalte) wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Expression der angegebenen Aktivierungsmarker vermessen und verglichen. B Expression von Aktivierungsmarkern einer nicht-transgenen Maus nach 7 Tagen, C einer Villin-HA transgenen Maus nach 7 Tagen und D einer Villin-HA transgenen Maus nach 28 Tagen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens vier Mäuse pro Versuchsgruppe.

3.2.3 Infiltration des intestinalen Epithels in Villin-HA Mäusen

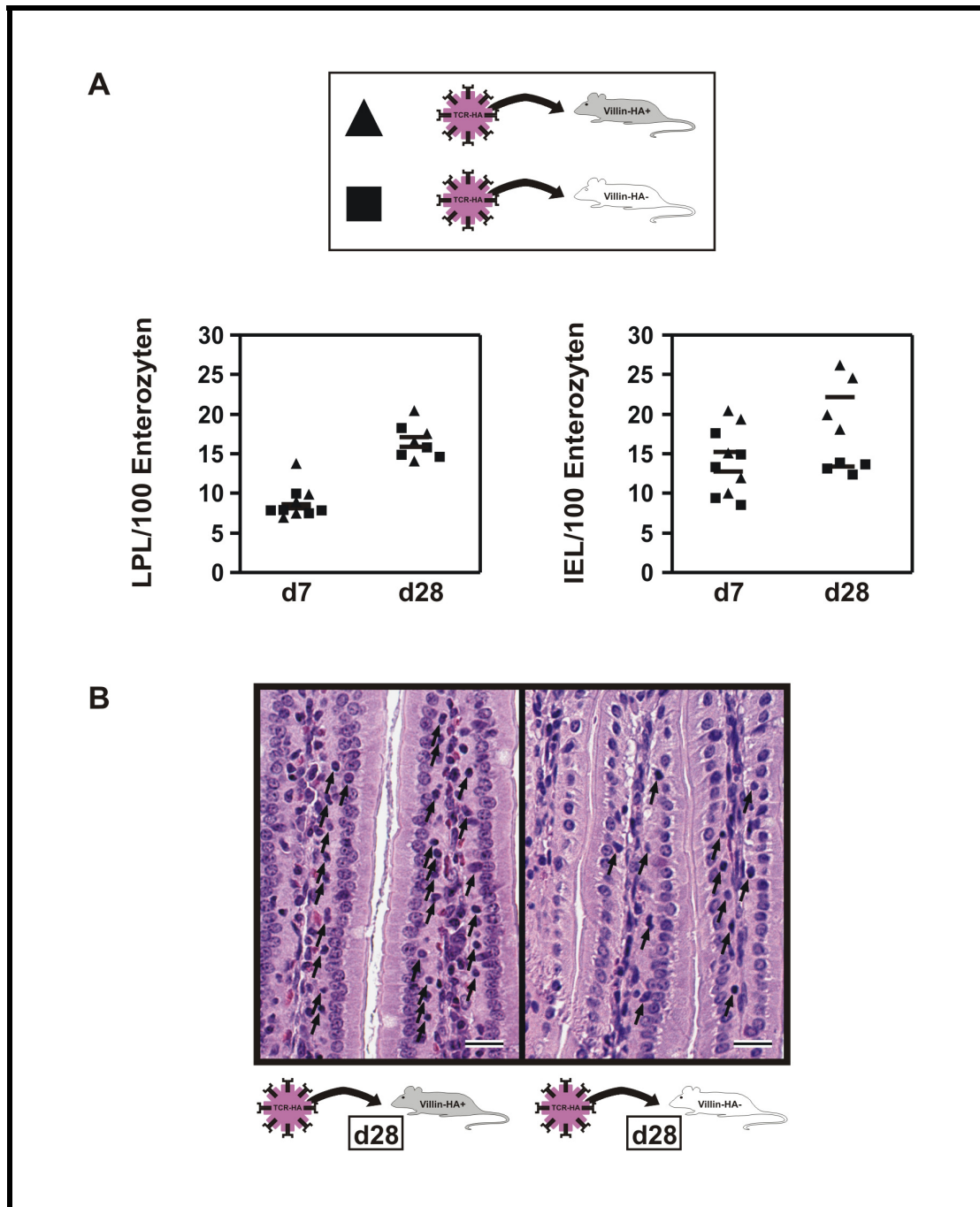


Abb. 3-9: Infiltration des Dünndarms durch Lymphozyten in Transferexperimenten

2.5 bis $3.0 \cdot 10^6$ 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvenen von Villin-HA-positiven (\blacktriangle) und Villin-HA-negativen Geschwistertieren (\blacksquare) transferiert. A Infiltration der Lamina Propria (links) und des intestinalen Epithels (rechts) durch Lymphozyten. 7 oder 28 Tage nach dem adoptiven Transfer wurden Villin-HA transgene und nicht transgene Geschwistertiere geopfert und Darmbiopsien entnommen. Histologische Paraffinschnitte wurden angefertigt, die infiltrierenden Lymphozyten ausgezählt und über die im Bildausschnitt sichtbaren Epithelzellen normalisiert. Die Mittelwerte sind als Balken dargestellt. Experimentgruppen bestanden jeweils aus 4 bis 6 Mäusen. B Infiltration des intestinalen Epithels durch Lymphozyten. Die Photos zeigen Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte. Links ist das intestinale Epithel einer Villin-HA transgenen Maus und rechts einer nicht-transgenen Geschwistermaus dargestellt. Die Pfeile verweisen auf infiltrierende Lymphozyten. Die Maßstäbe in den Photos repräsentieren jeweils 60 µm.

Aus transgenen Villin-HA (▲) und nicht-transgenen Empfängerermäusen (■) wurden 7 und 28 Tage nach dem adoptiven Transfer von 6.5^- $CD4^+$ T-Zellen Darmbiopsien entnommen und in histologischen, Hämatoxylin und Eosin (H & E) gefärbten Schnitten auf eine Infiltration des Darms durch Lymphozyten analysiert (Abb. 3-9). Die Angaben hinsichtlich der Werte der ausgezählten Lymphozyten beziehen sich jeweils auf 100 Enterozyten.

Abb. 3-9 zeigt im Diagramm die Ergebnisse dieser Auszählungen. Nach 7 Tagen zeigten sich im Darm keine nachweisbaren Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der infiltrierenden Lymphozyten in der Lamina propria (links) und im intestinalen Epithel (rechts). Diese Werte betrugen für die Lamina propria $8,6 \pm 1,7$ Lymphozyten auf 100 Enterozyten im Vergleich zu $8,3 \pm 1,0$ Lymphozyten auf 100 Enterozyten, und für das intestinale Epithel $15,3 \pm 4,4$ Lymphozyten auf 100 Enterozyten in transgenen Villin-HA Mäusen im Vergleich zu $12,8 \pm 3,8$ Lymphozyten auf 100 Enterozyten in nicht-transgenen Geschwistertieren. 28 Tage nach dem adoptiven Transfer konnte eine erhöhte Anzahl infiltrierender Lymphozyten in der Lamina propria nachgewiesen werden, diese Erhöhung war allerdings unspezifisch, da sowohl in Villin-HA transgenen ($17,1 \pm 2,7$), als auch in nicht-transgenen Geschwistertieren ($15,9 \pm 2,0$) diese Werte erhöht waren. Hingegen war im intestinalen Epithel von Villin-HA transgenen Mäusen nach 28 Tagen eine spezifische Infiltration von Lymphozyten nachweisbar, hier waren $22,1 \pm 3,8$ im Vergleich zu $13,3 \pm 0,7$ Lymphozyten in Kontrollmäusen nachweisbar, was eine Verdopplung der infiltrierenden Lymphozyten im intestinalen Epithel darstellt (s. Abb. 3-9B). Weitere morphologische Veränderungen waren im Darmepithel von Villin-HA transgenen Mäusen in histologischen Schnitten nicht sichtbar.

3.2.4 In-vivo Proliferation transferierter 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen

Um die Frage zu beantworten, ob transferierte T-Zellen in Villin-HA Mäusen aufgrund der Anwesenheit ihres spezifischen Antigens in Darmepithelzellen proliferierten, was vom transgenen TCR der 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen erkannt wird, wurden adoptiv zu transferierende T-Zellen mit dem Farbstoff CFSE markiert. In proliferierenden Zellen sollte sich aufgrund von Zellteilungen eine Verringerung der Farbstoffkonzentration nachweisen lassen. Abb. 3-10A zeigt das Versuchsschema dieser Transferexperimente. Lymphozyten wurden aus den MLN und Milzen TCR-HA transgener Mäuse isoliert, gepoolt und mit dem Farbstoff CFSE markiert. Nach einer Anreicherung der $CD4^+$ T-

Zellen wurde der Anteil transgener $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Der Anteil an $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen betrug wie in den vorherigen Transferexperimenten 25 bis 30%. Jeweils $1 \cdot 10^7$ angereicherte $CD4^+$ T-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvenen von transgenen Villin-HA Mäusen (grau, untere Reihe) und nicht-transgenen Geschwistermäusen (weiß, obere Reihe) injiziert. 7 Tage nach dem adoptiven Transfer wurden die Empfängermause geopfert und die Lymphozyten aus den angegebenen Organen isoliert. Im Durchflusszytometer wurden $CD4^+$ T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression des transgenen TCR (6.5) und ihres CFSE-Gehaltes vermessen, die Ergebnisse sind in den Dot-plots der Abb. 3-10B und C dargestellt. Für die gekennzeichneten Regionen wurde der Gehalt an $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in den gezeigten Kompartimenten bestimmt und als Prozentwert angegeben. In den kleineren Regionen wurde zusätzlich der MFI-Wert (**M**ean **F**luorescence **I**ntensity) bestimmt (rote Zahlen).

Der Transfer mit CFSE-markierten T-Zellen bestätigte, dass $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in MLN von Villin-HA Mäusen akkumulieren (vgl. dazu Abb. 3-7). In den MLN Villin-HA transgener Mäusen waren 1,4% transgene T-Zellen im Vergleich zu 0,5% nicht-transgenen Mäusen nachweisbar. Ebenfalls war der Anteil $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen von Villin-HA Mäusen in den Peyerschen Plaques mit 0,7% und in der Lamina propria mit 1,7% gegenüber nicht-transgenen Geschwistertieren mit 0,1% und 0,3% erhöht. In der Milz und im intestinalen Epithel von Villin-HA und nicht-transgenen Mäusen waren die Anteile $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen identisch und betrugen für beide Mausgruppen 0,4% bzw. 0,2%.

Die CFSE-markierte $CD4^+$ T-Zellpopulation hob sich in den Messungen deutlich von unmarkierten endogenen T-Zellen ab. T-Zellen, die keine Zellteilung durchlaufen hatten, wiesen eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ca. 750 relativen Einheiten auf. Es ist deutlich zu erkennen, dass es nur in transgenen Villin-HA Mäusen innerhalb der $6.5^+ CD4^+$ Subpopulation (gekennzeichnete größere Regionen in den Dot-plots) zur Verringerung der Farbstoffkonzentration und damit zur Proliferation kam. Nur in den MLN wurde eine Proliferation $6.5^+ CD4^+$ CFSE-markierter T-Zellen beobachtet, die Proliferation war allerdings nur hier sichtbar und nicht so ausgeprägt wie in $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen. In nicht-transgenen Mäusen war in keinem Fall eine Proliferation der Zellen nachweisbar.

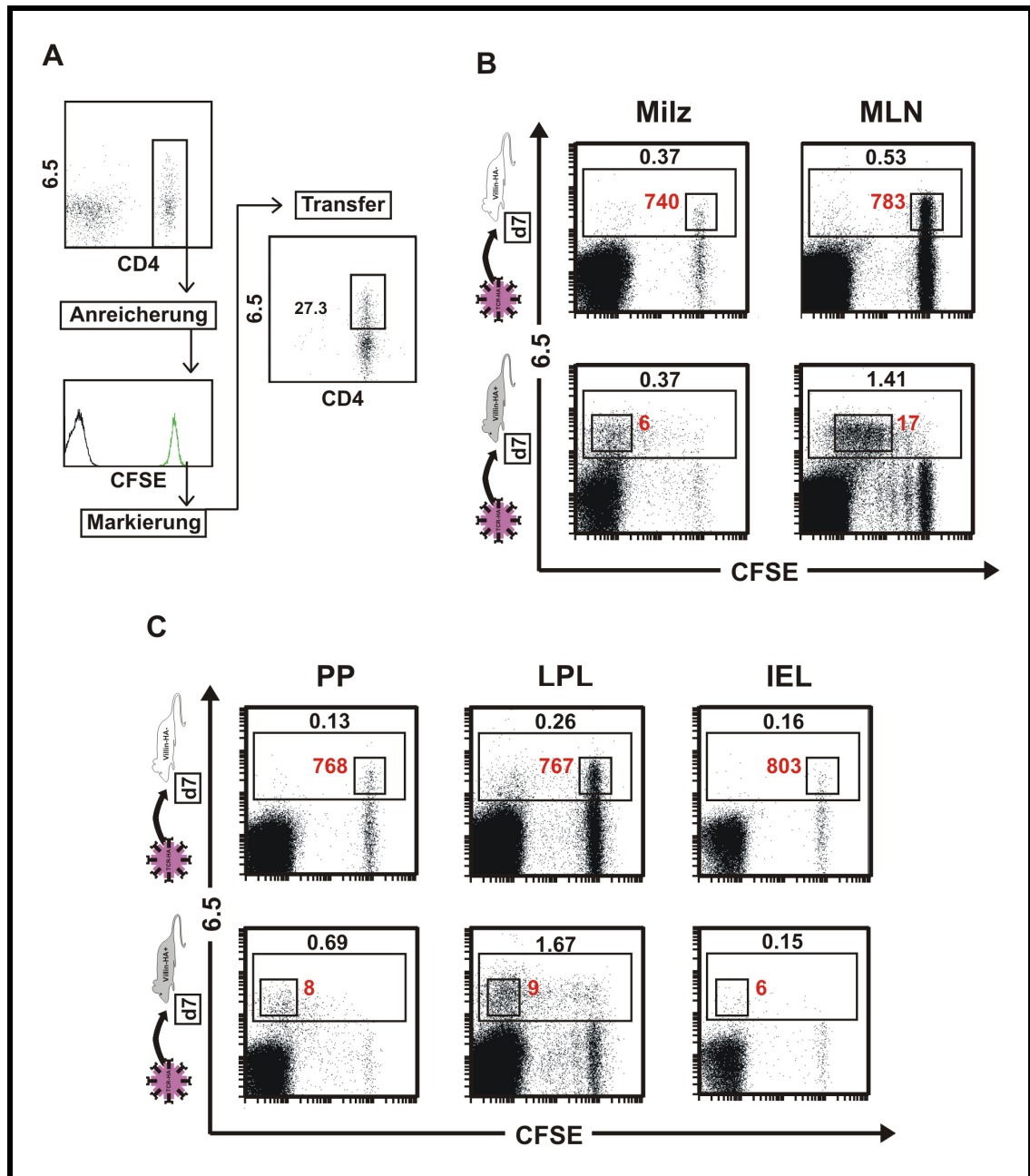


Abb. 3-10: Proliferation adoptiv transferierter 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen

A Versuchsschema. Lymphozyten aus Milz und MLN von TCR-HA Mäusen wurden isoliert, $CD4^+$ T-Zellen angereichert und mit dem Farbstoff CFSE markiert. Im Durchflusszytometer wurde die Markierung der Zellen überprüft und die Expression des transgenen TCR (6.5) in der angereicherten $CD4^+$ T-Zellpopulation bestimmt. Der Anteil 6.5^+ T-Zellen betrug 25-30%. Jeweils $1 \cdot 10^7$ angereicherte $CD4^+$ T-Zellen, entsprechend ca. 2.5 bis $3.0 \cdot 10^6$ 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvenen von Villin-HA-positiven (grau, untere Reihe) und Villin-HA-negativen Mäusen (weiß, obere Reihe) injiziert. B und C Bestimmung des CFSE-Gehaltes in 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen. 7 Tage nach dem Transfer wurden Empfänger-mäuse geopfert und die Lymphozyten aus den angegebenen Organen isoliert. Im Durchflusszytometer wurden $CD4^+$ T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression des transgenen TCR (6.5) und ihres CFSE-Gehaltes vermessen, die Ergebnisse sind in Dot-plots dargestellt. Für die gekennzeichneten Regionen wurde der Gehalt an 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in den gezeigten Kompartimenten bestimmt und als Prozentwerte angegeben. Rote Zahlen geben die MFI-Werte für die kleineren Regionen an. B zeigt den CFSE-Gehalt $CD4^+$ T-Zellen in der Milz und den MLN, C den CFSE-Gehalt in den Peyerschen Plaques, der Lamina propria und dem intestinalen Epithel. Die Ergebnisse sind repräsentativ für eine von jeweils mindestens zwei untersuchten Mäusen pro Versuchsgruppe.

Eine Analyse der Verteilung von 6.5^+ $CD4^+$ CFSE-markierten T-Zellen in den gekennzeichneten Regionen ließ den Schluss zu, dass transgene T-Zellen sich vornehmlich in den MLN und in der Lamina propria teilten, da hier neben jüngeren Tochterzellen mit niedrigeren MFI (17 für die MLN, 9 für die Lamina propria) auch „ältere“ T-Zellen mit hohen MFI (~ 750), sowie diverse Teilungsstadien mit mittleren MFI-Werten sichtbar waren. Gemäß der ermittelten MFI-Werte und ihrer Halbierung bei jeder Zellteilung hatten sich die spezifischen CFSE-markierten 6.5^+ $CD4^+$ Zellen mit den niedrigsten MFI-Werten sechsmal innerhalb der sieben Tage geteilt.

In der Milz und den Peyerschen Plaques waren nur „junge“ Zellen mit niedrigen MFI-Werten nachweisbar, wahrscheinlich waren diese T-Zellen über das Blut in diese Kompartimente eingewandert. Im Gegensatz zur Milz akkumulierten 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen aber in den Peyerschen Plaques Villin-HA transgener Mäuse, da hier der Anteil 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen mit 1,7% gegenüber nicht-transgenen Mäusen mit 0,3% erhöht war. Im intestinalen Epithel von transgenen Villin-HA Mäusen und nicht-transgenen Geschwistermäusen waren nur wenige 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen nachweisbar.

3.3 Autoimmunes Villin-HA x TCR-HA Modell

Villin-HA Mäuse stellen ein geeignetes Modell dar, um die Frage zu beantworten, ob enterozytenspezifische $CD4^+$ T-Zellen unter autoimmunen Bedingungen eine Immunantwort auslösen können, die zu einer chronischen intestinalen Entzündung führt. Dieses antigenspezifische Modell erlaubt es im Gegensatz zu anderen bereits existierenden Modellen auch, die Mechanismen aufzuklären, über die MHC Klasse-II-restringierte HA-spezifische $CD4^+$ T-Zellen wirken und welche Effektormechanismen im doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Modell entweder zu einer Toleranz oder zu einer intestinalen Inflammation führen. Zu diesem Zweck wurden transgene Villin-HA Mäuse mit TCR-HA transgenen Mäusen gekreuzt, die einen $\alpha:\beta$ -TCR exprimieren, der das MHC Klasse-II-restringierte Epitop $HA_{110-120}$ erkennt. Hierfür wurden Villin-HA Mäuse verwendet, die für mindestens fünf Generationen auf einen BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt worden waren. Doppelt-transgene Villin-HA x TCR-HA Mäuse und Kontrollmäuse wurden in einem Alter zwischen 8 und 12 Wochen für die gezeigten Experimente verwendet.

3.3.1 Zentrale Toleranz im Thymus von Villin-HA x TCR-HA Mäusen

Zunächst sollte untersucht werden, ob autoreaktive T-Zellen im Thymus von doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen negativ deletiert werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Thymozyten aus doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen der Linien 1 und 2 sowie aus TCR-HA Kontrollmäusen isoliert, mit CD4-, CD8- und 6.5-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch vermessen (Abb. 3-11). Kontroll TCR-HA Mäuse werden in der oberen Reihe und Villin-HA x TCR-HA Mäuse der transgenen Linien 1 und 2 in der mittleren bzw. unteren Reihe präsentiert.

Die Prozentzahlen für doppelt-negative ($CD4^- CD8^-$), doppelt-positive ($CD4^+ CD8^+$), $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten in TCR-HA x Villin-HA Mäusen waren denen aus TCR-HA Mäusen weitgehend ähnlich. Eine Ausnahme stellte der höhere Anteil an $CD4^+ CD8^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 1 da, hier waren 79% der T-Zellen im Vergleich zu 72% bei TCR-HA und 73% bei doppelt-transgenen Mäusen der Linie 2 doppelt-positiv. Entsprechend waren die Anteile der drei anderen Populationen in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 1 leicht reduziert.

Die Prozentzahl 6.5^+ Thymozyten war in der $CD4^+ CD8^-$ Subpopulation in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 1 dramatisch reduziert. Nur 2,4% im Vergleich zu 42,4% der T-Zellen bei TCR-HA Mäusen zeigten eine Expression des transgenen TCR, folglich wurden über 90% der sich entwickelnden Lymphozyten in doppelt-transgenen Linie 1 Mäusen deletiert. In doppelt-transgenen Mäusen der Linie 2 wiesen 34,3% der $CD4^+$ Thymozyten eine Expression des transgenen TCR auf. Eine schwache negative Deletion wurde auch für $CD8^+$ T-Zellen im Thymus von doppelt-transgenen Mäusen der Linie 1 gemessen. Während in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 1 nur 18,8% der T-Zellen einen transgenen TCR exprimierten, wurde für doppelt-transgene Mäuse der Linie 2 ein Anteil von 26,4% gemessen, was mit dem ermittelten Wert von 25,3% in TCR-HA Mäusen nahezu übereinstimmte. Der Prozentsatz doppelt-transgener 6.5^+ Thymozyten war ebenfalls nur in Mäusen der Linie 1 reduziert, nur 5,5% der Zellen wiesen einen transgenen TCR auf. Im Gegensatz dazu betrugen die Anteile 6.5^+ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 2 20,4% und in TCR-HA Mäusen 17,6%. Die Anteile doppelt-negativer T-Zellen, die den transgenen TCR exprimierten, waren in allen drei Mäusen ähnlich und betrugen ca. 25%.

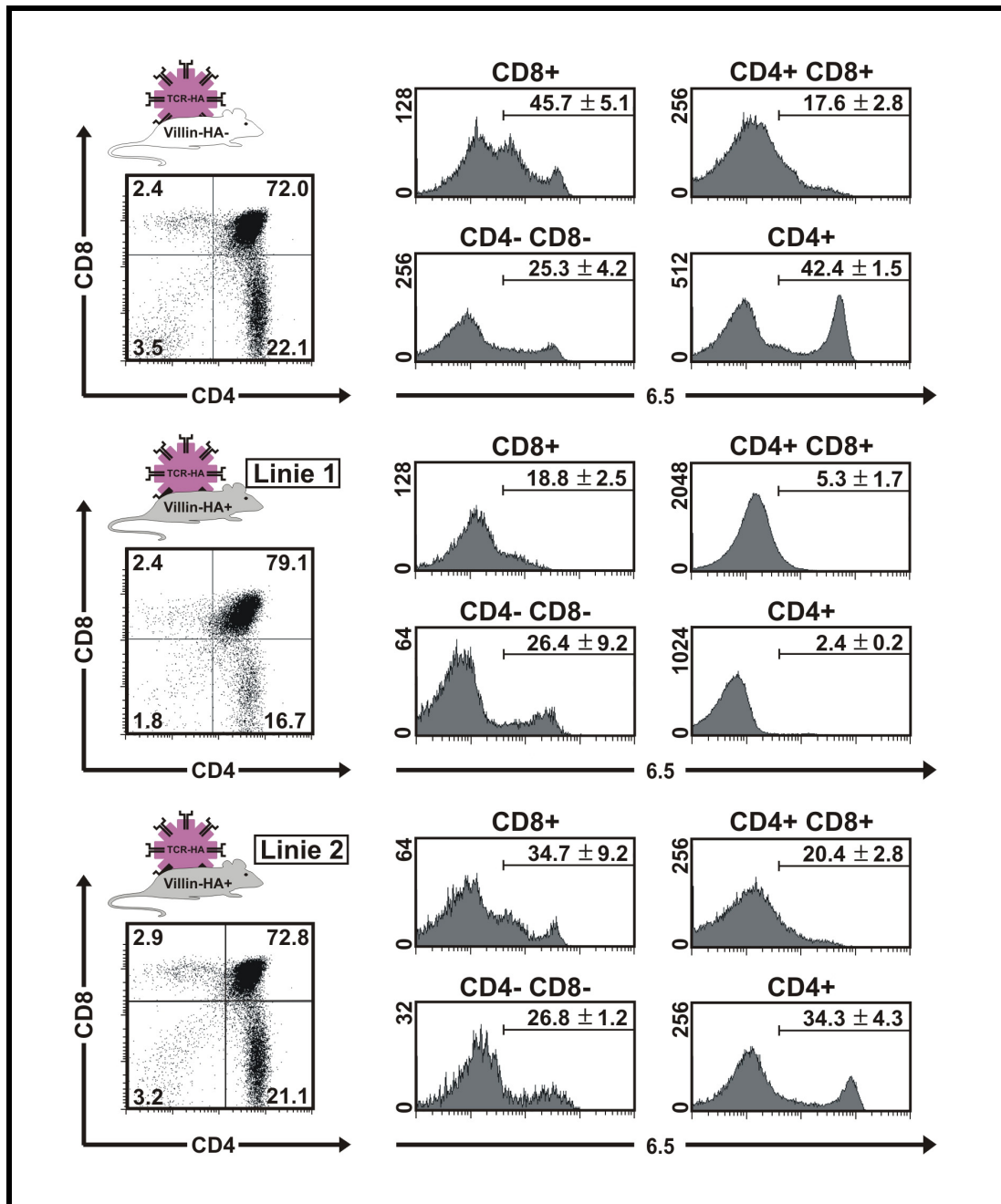


Abb. 3-11: Zentrale Toleranz und Entwicklung von 6.5⁺ CD4⁺ Lymphozyten im Thymus

Kontroll TCR-HA Mäuse (obere Reihe) und Villin-HA x TCR-HA Mäuse der transgenen Linien 1 (mittlere Reihe) und 2 (untere Reihe) wurden in einem Alter zwischen 8 und 12 Wochen geopfert. Die isolierten Thymozyten wurden mit CD4-, CD8- und 6.5-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch vermessen. Die Dot Plots zeigen die gemessenen Prozentwerte der sich entwickelnden CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ and CD8⁺ Zellen. Die Zellen dieser Subpopulationen (eingefügter Quadrant Marker) wurden hinsichtlich ihrer Expression des transgenen TCR (6.5) in Histogrammen analysiert. Die Histogrammarker geben die Prozentzahlen 6.5-positiver T-Zellen in den entsprechenden Subpopulationen an. Die gezeigten Daten repräsentieren 2 unabhängige Experimente mit jeweils 2 Mäusen pro Gruppe.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass 6.5⁺ T-Zellen in Villin-HA x TCR-HA Mäusen der Linie 1 einer stringenten negativen Deletion im Thymus ausgesetzt waren, Villin-HA x TCR-HA Mäuse der Linie 2 hingegen einer geringeren Deletion.

Basierend auf diesem Ergebnis wurden für den weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich Villin-HA Mäuse der Linie 2 verwendet und mit TCR-HA Mäusen verpaart. Die wenigen $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen, die in doppelt transgenen Villin-HA Linie 1 x TCR-HA Mäusen der Deletion im Thymus entgingen, hätten weitere Experimente aufgrund niedriger verfügbarer Zellzahlen erschwert.

3.3.2 $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in den lymphatischen Organen Villin-HA x TCR-HA transgener Mäuse

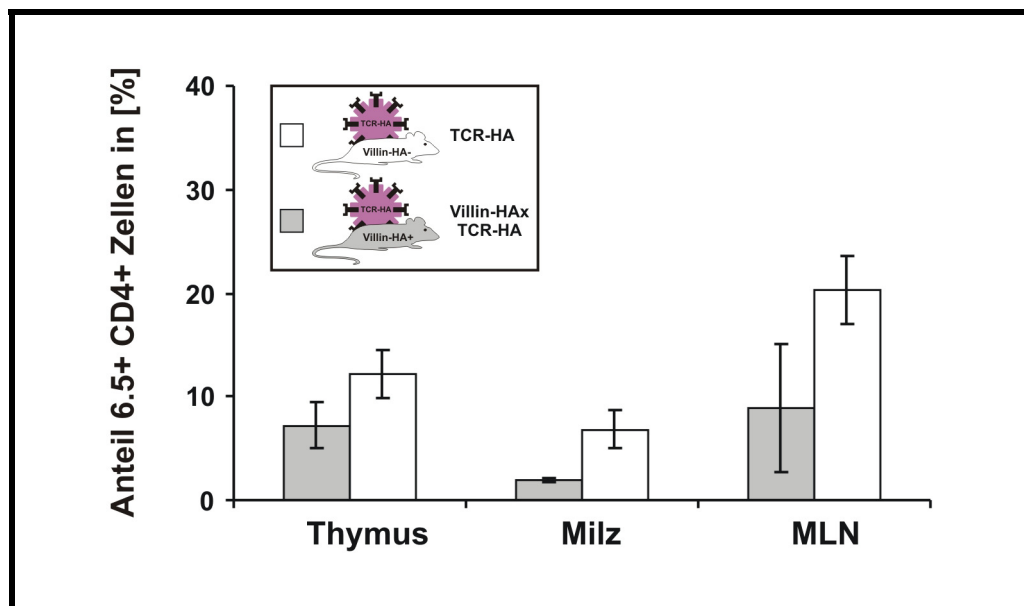


Abb. 3-12: Anteil $6.5^+ CD4^+$ transgener T-Zellen in lymphatischen Organen
Anteil $6.5^+ CD4^+$ transgener T-Zellen in den lymphatischen Organen. Der Anteil $6.5^+ CD4^+$ transgener T-Zellen wurde durchflusszytometrisch im Thymus, in der Milz und den MLN für doppelt-transgene Linie 2 Mäuse (grau) und TCR-HA transgene Mäuse (weiß) bestimmt und im Balkendiagramm miteinander verglichen. TCR-HA transgene Mäuse sind durch lilafarbene T-Zellen an den Mäusen symbolisiert. Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse aus mindestens fünf verschiedenen Mäusen mit ihren Standardabweichungen.

Des weiteren sollten die Anteile $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen im Thymus, in den MLN und in der Milz von doppelt-transgenen Villin-HA Linie 2 x TCR-HA Mäusen (grau) und TCR-HA Mäusen (weiß) durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die gemessenen Prozentzahlen transgener T-Zellen sind in Abb. 3-12 in einem Balkendiagramm dargestellt. Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen im Thymus von doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu TCR-HA Mäusen im Durchschnitt um ca. 40% reduziert war, im Thymus doppelt-transgener Mäuse wurden $7,2 \pm 2,1\%$, im Thymus von TCR-HA Mäusen $12,2 \pm 2,3\%$ transgene T-Zellen gemessen. In den MLN

zeigte sich ein ähnliches Bild. In doppelt-transgenen Mäusen betrug die Reduktion transgener T-Zellen im Vergleich zu TCR-HA Mäusen ca. 43%, in Villin-HA x TCR-HA Mäusen stellten $8,9 \pm 6,2\%$ der Lymphozyten $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen dar, in TCR-HA Mäusen betrug dieser Anteil $20,3 \pm 3,2\%$. In der Milz von Villin-HA x TCR-HA Mäusen war der prozentuale Anteil an $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu TCR-HA Mäusen sogar um 73% verringert, in doppelt-transgenen Mäusen betrug der Anteil an $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen $1,9 \pm 0,2\%$ und in TCR-HA Mäusen $6,8 \pm 1,9\%$.

3.3.3 Aktivierung von $6.5^+ CD4^+$ Lymphozyten in Villin-HA x TCR-HA Mäusen

Um die $6.5^+ CD4^+$ T Zellen aus Villin-HA x TCR-HA Mäusen hinsichtlich ihrer Expression von Aktivierungsmarkern zu analysieren, wurden T-Zellen aus der Milz, den MLN, der Lamina propria und dem intestinalen Epithel isoliert und mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD25, CD45RB, CD62L, CD69 markiert. Die Expressionsprofile zwischen Villin-HA x TCR-HA (dicke Linien) und TCR-HA Mäusen (dünne Linien) wurden durchflusszytometrisch gemessen und miteinander verglichen (Abb. 3-13). Die prozentualen Anteile der T-Zellen für Villin-HA x TCR-HA Mäuse und TCR-HA Mäusen werden über und unter den eingefügten Histogrammarkern angegeben.

In der Milz von Villin-HA x TCR-HA zeigte sich ein gesteigerter Prozentsatz CD69-positiver $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen (32.0%) im Vergleich zu TCR-HA Mäusen (13.8%). In den MLN war die gesteigerte Expression von CD69 in Villin-HA x TCR-HA Mäusen noch deutlicher, 59% der T-Zellen exprimierten CD69, was im Vergleich zu TCR-HA Mäusen einen fünffachen Anstieg darstellt. In der Lamina propria war hingegen der Anteil aktivierter T-Zellen mit 80% und 84% nahezu identisch. Im intestinalen Epithel war die Expression von CD69 mit 85% gegenüber TCR-HA Mäusen mit 70% geringfügig erhöht, jedoch waren im intestinalen Epithel nur sehr wenige $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen nachweisbar. Auch für den IL2-Rezeptor (CD25) war in doppelt-transgenen Mäusen ein Anstieg der Expression nachweisbar, so exprimierten in der Milz 47% und in den MLN 36% der T-Zellen CD25 gegenüber 23% und 8% in TCR-HA Mäusen. Auch in der Lamina propria und im intestinalen Epithel waren die Anteile CD25-positiver $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen doppelt-transgener Mäuse mit 26% und 10% gegenüber TCR-HA Mäusen mit 7% und 2% erhöht. In weiteren durchflusszytometrischen

Messungen mit Vierfachfärbungen (6.5, CD4, CD25, CD69) konnte weiterhin gezeigt werden, dass $6.5^+ CD4^+ CD25^+$ und $6.5^+ CD4^+ CD69^+$ weitgehend voneinander getrennt Subpopulationen darstellten, da ein Großteil der vermessenen T-Zellen entweder CD25 oder aber CD69 exprimierten (Daten nicht gezeigt).

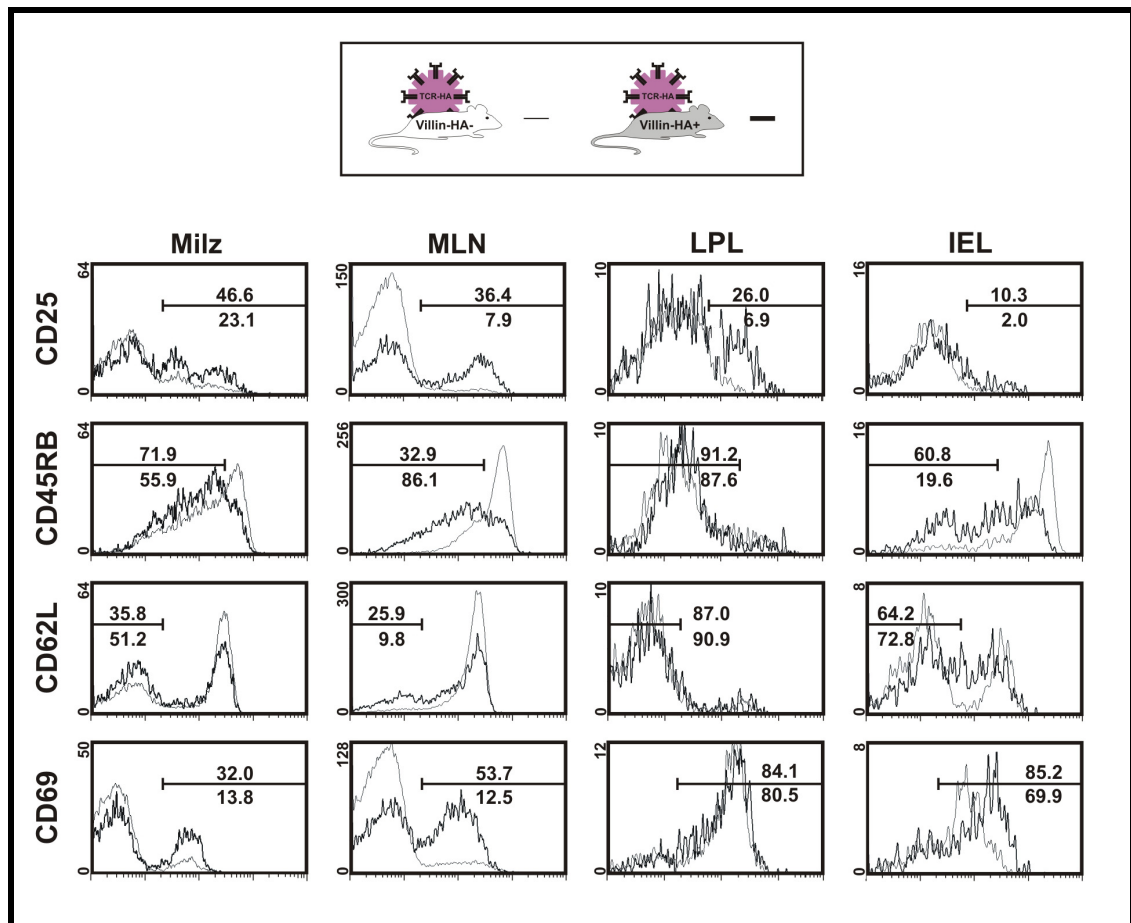


Abb. 3-13: Aktivierung von $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in Villin-HA x TCR-HA transgenen Mäusen
T-Zellen wurden aus Milz, MLN, Lamina propria und intestinalen Epithel von TCR-HA transgenen und von Villin-HA x TCR-HA transgenen Mäusen isoliert. Die Zellen wurden mit 6.5 und CD4-Antikörpern und zusätzlich mit Antikörpern gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD45RB, CD62L und CD69 markiert. Im Durchflusszytometer wurden die $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen selektiert und auf die Expression der angegebenen Aktivierungsmarker in Histogrammen analysiert. Daten von TCR-HA transgenen Mäusen sind durch dünne, Daten von Villin-HA x TCR-HA transgenen Mäusen durch dicke Linien gekennzeichnet. Ein Histogrammmarker wurde eingefügt, um die Prozentzahlen aktivierter T-Zellen für die angegebenen Oberflächenmarker zu bestimmen. Die Prozentzahlen von Villin-HA x TCR-HA und TCR-HA Mäusen sind über und unter der Markerregion angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Das Oberflächenantigen CD45RB wird auf aktivierten T-Zellen herunterreguliert. Während in der Milz nur geringfügige Unterschiede in der Expression dieses Oberflächenantigens sichtbar waren, zeigten transgene T Zellen aus den MLN von Villin-HA x TCR-HA Mäusen mit 86% im Vergleich zu TCR-HA Mäusen eine deutlich

verringerte Expression mit 33%. Gleichsam war der Anteil von CD45RB^{lo} 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen im intestinalen Epithel von doppelt-transgenen Mäusen erhöht, hier wiesen 61% der T-Zellen im Vergleich zu 20% in TCR-HA Mäusen eine niedrige Expression des Oberflächenantigens auf. In der Lamina propria waren hingegen keine Unterschiede in der Expression von CD45RB sichtbar. Als letztes wurde das Oberflächenantigen CD62L gemessen, welches auf naiven T-Zellen exprimiert wird, jedoch bei deren Aktivierung herunterreguliert wird. 36% der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von doppelt-transgenen Mäusen wiesen keine Expression von CD62L auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu 51% in Kontroll TCR-HA Mäusen auf. Während in der Milz die Unterschiede demnach gering waren, zeigte sich in den MLN ein Anstieg CD62L-negativer Lymphozyten in doppelt-transgenen Mäusen auf 26% gegenüber 10% in TCR-HA Mäusen. In der Lamina propria und im intestinalen Epithel waren nur geringfügige Unterschiede in der Expression von CD45RB nachweisbar. Keine Unterschiede in der Expression von Oberflächenantigenen konnten in Villin-HA x TCR-HA und TCR-HA Mäusen für 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 In-vitro Proliferation von 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression von HA auf B-Zellen unter der Kontrolle eines Ig- κ Promotors zu zentraler und peripherer Toleranz der T-Zellen führt (Buer *et al.*, 1998). Um die Frage zu beantworten, ob 6.5⁺ CD4⁺ T in doppelt-transgenen Mäusen funktionell oder aber anerg waren, wurden T-Zellen aus der Milz von Villin-HA, TCR-HA, doppelt-transgenen und nicht-transgenen Geschwistertieren isoliert und für *in-vitro* Antigenstimulationsexperimente benutzt. Die T-Zellen wurden mit 0, 1, 3 oder 10 μ g/ml des spezifischen HA-Peptids SSFERFEIFPK stimuliert und anschließend hinsichtlich des Einbaus von ³H-Thymidin am Szintillator vermessen (Abb. 3-14A).

In Villin-HA und nicht-transgenen Mäusen war keine spezifische Proliferation von Lymphozyten messbar. Dagegen zeigten TCR-HA und doppelt-transgene Mäuse in Gegenwart ihres spezifischen Antigens einen Einbau von ³H-Thymidin mit ca. $1,0 \cdot 10^5$ und $0,5 \cdot 10^5$ cpm (counts per minute) und proliferierten somit. Ähnliche Resultate wurden in Antigenstimulationsexperimenten mit MLN Lymphozyten erhalten (Daten

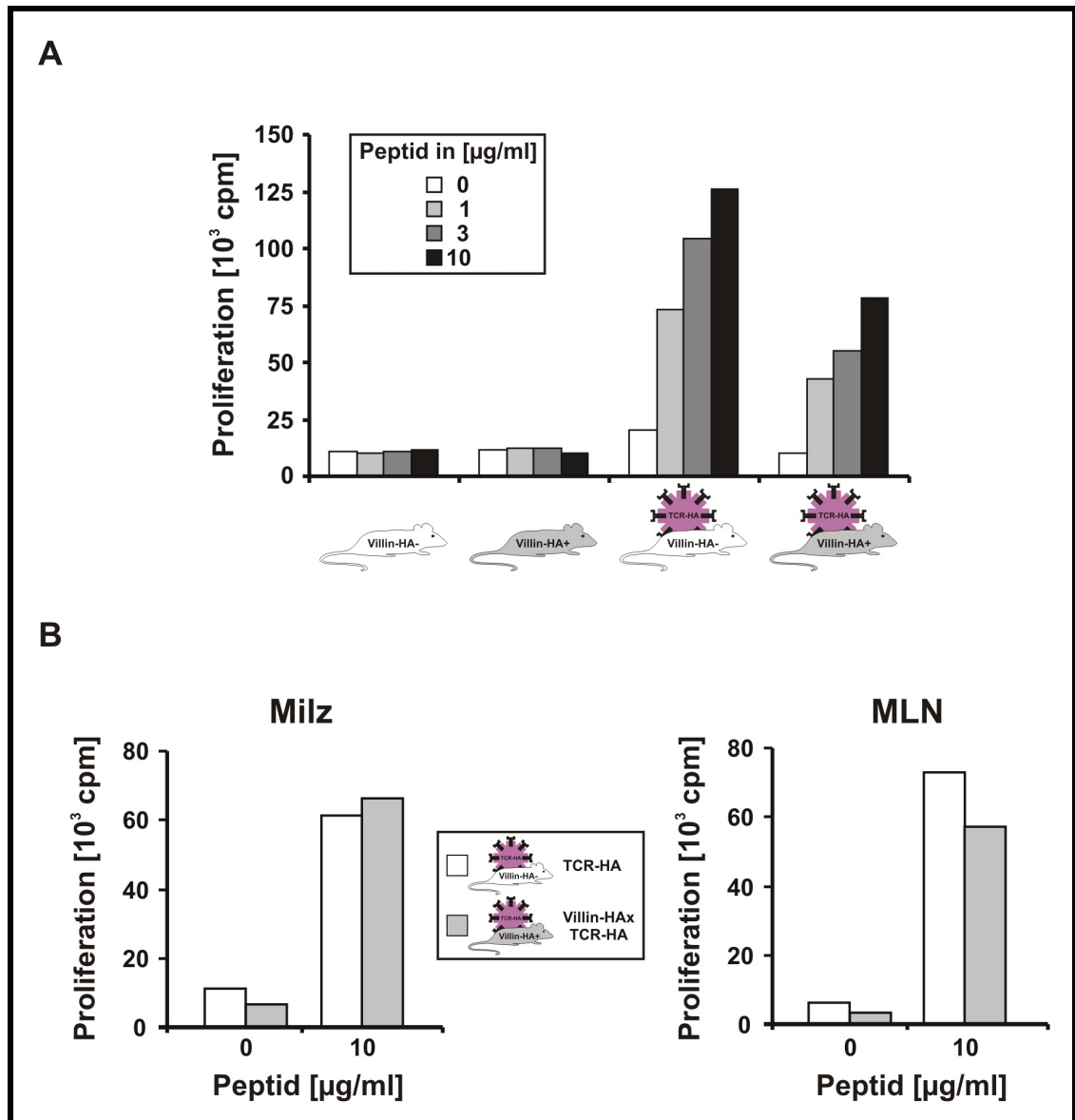


Abb. 3-14: Antigenstimulationsversuche mit 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen

Für Antigenstimulationsexperimente wurden Mäuse in einem Alter von 8 bis 12 Wochen geopfert und die angegebenen Lymphozytenpopulationen isoliert. $5 \cdot 10^5$ Lymphozyten wurden pro well in einer 96-well Mikrotiterplatte in 200 µl Medium in Triplikaten ausgesät. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit 3H -Thymidin gepulst und der Einbau an 3H -Thymidin am Szintillator gemessen. Die Diagramme stellen den Einbau an 3H -Thymidin in den jeweiligen Lymphozytenpopulationen in [10^3 cpm] dar. A Antigenstimulation von 6.5^+ $CD4^+$ Splenozyten aus nicht-transgenen, Villin-HA transgenen, TCR-HA transgenen und doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen. Die Lymphozyten wurden mit 0, 1, 3 oder 10 µg/ml HA-Peptid (SSFERFEIFPK) stimuliert. B Antigenstimulationsassays mit nivellierten Zellzahlen an 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen aus Villin-HA x TCR-HA- (grau) und TCR-HA Mäusen (weiß). Die Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 µg/ml HA-Peptid inkubiert. Am Durchflusszytometer war zuvor der Gehalt an 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in den jeweiligen Lymphozytenpopulationen bestimmt worden, und 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen wurden in identischen Zellzahlen für die Antigenstimulation eingesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei bzw. zwei Experimente.

nicht gezeigt). Demnach war die Proliferation von 6.5^+ T-Zellen in Villin-HA x TCR-HA Mäusen im Vergleich zu TCR-HA Mäusen um die Hälfte verringert, dabei muss

jedoch berücksichtigt werden, dass die Anzahl transgener T-Zellen gegenüber TCR-HA Mäusen in doppelt-transgenen Mäusen verringert war.

Um die Kapazität transgener T-Zellen zur Proliferation direkt miteinander vergleichen zu können, wurden FACS Analysen vorgenommen, um den Anteil $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen zu bestimmen und durch Zugabe von BALB/c Splenozyten anzugleichen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 3-14B dargestellt und wurden für Splenozyten (links) und MLN Lymphozyten (rechts) durchgeführt. Der Einbau an 3H -Thymidin zeigte, dass bezüglich der Fähigkeit der T-Zellen, in Gegenwart des spezifischen HA-Peptids zu proliferieren, zwischen Villin-HA x TCR-HA und TCR-HA Mäusen kein Unterschied bestand. Der Einbau an 3H -Thymidin betrug sowohl für antigenstimulierte MLN Lymphozyten als auch für antigenstimulierte Splenozyten ca. $0,6 \cdot 10^5$ cpm.

3.3.5 Infiltration des Dünndarms von Villin-HA x TCR-HA Mäusen durch $CD3^+$ Lymphozyten

In Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten des Ileums von doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA (\blacktriangle), Villin-HA (\bullet) und TCR-HA Mäusen (\blacksquare) wurden die Werte der LPL und IEL bestimmt (Abb. 3-15A). Das LPL Kompartiment von Villin-HA x TCR-HA Mäusen wies mit $22,8 \pm 8,7$ LPL im Vergleich zu TCR-HA Kontrollmäusen mit $8,2 \pm 1,5$ LPL auf 100 ausgezählte Enterozyten eine dreifach gesteigerte Infiltration von Lymphozyten auf. Für das IEL Kompartiment zeigte sich eine nur leichte Infiltration von Lymphozyten in doppelt-transgenen Mäusen mit $13,8 \pm 3,6$ IEL im Vergleich zu TCR-HA Mäusen mit $8,9 \pm 1,4$ IEL auf 100 ausgezählte Enterozyten. Die morphologische Begutachtung von histologischen Schnitten des Dünndarms von Villin-HA x TCR-HA Mäusen zeigte demnach einen Anstieg der infiltrierenden IEL and LPL in der intestinalen Mukosa von doppelt-transgenen Mäusen gegenüber TCR-HA Mäusen (Abb. 3-15B).

Zusätzlich waren moderate Lymphödeme im Dünndarm sichtbar. Eine Schädigung der epithelialen Zellschicht in Villin-HA x TCR-HA Mäusen konnte nicht beobachtet werden. Ebenso waren keine auffälligen Veränderungen hinsichtlich der Anzahl, Größe und Struktur der Peyerschen Plaques nachweisbar. Weiterhin wurden auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um $CD3^+$ Lymphozyten in den histologischen Schnitten nachzuweisen (Bildausschnitte in Abb. 3-15B). Schnitte aus

doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen zeigten gegenüber TCR-HA Mäusen eine signifikante Erhöhung der infiltrierenden $CD3^+$ Lymphozyten.

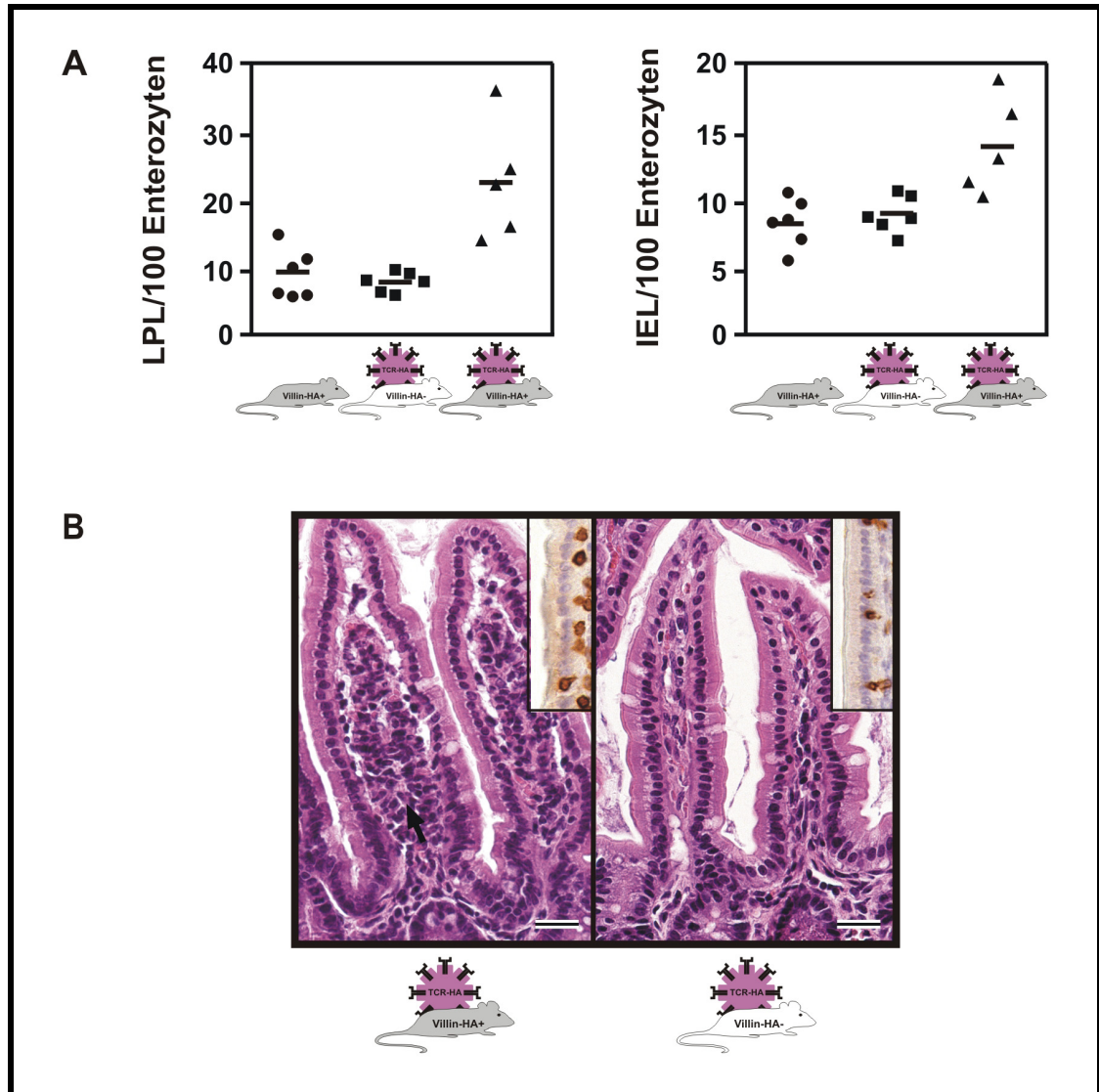


Abb. 3-15: Infiltration des Dünndarms durch Lymphozyten

A Infiltrierende Lymphozyten in der Lamina propria und im intestinalen Epithel. Aus 8 bis 12 Wochen alten Villin-HA transgenen (●), TCR-HA transgenen (■) und Villin-HA x TCR-HA doppelt-transgenen Mäusen (▲) wurden Darmbiopsien entnommen und histologische Paraffinschnitte angefertigt. Die infiltrierenden Lymphozyten in der Lamina propria und im intestinalen Epithel wurden ausgezählt und über die im Bildausschnitt sichtbaren Epithelzellen normalisiert. Experimentgruppen bestanden jeweils aus 5 bis 6 Mäusen. Die Mittelwerte dieser Messungen sind als Balken dargestellt. B Infiltration der Lamina propria durch Lymphozyten. Beide Photos zeigen Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte der Lamina propria. Links ist die Lamina propria einer Villin-HA x TCR-HA transgenen Maus, rechts die Lamina propria einer TCR-HA transgenen Geschwistermaus dargestellt. Der Pfeil verweist auf infiltrierende Lymphozyten. Die Maßstäbe in den Photos repräsentieren jeweils 100 μ m. Die Bildausschnitte rechts oben zeigen Paraffin-eingebettete Biopsien in einem Maßstab von 80 μ m, die mit α -CD3 Antikörpern und Diaminobenzidin als Substrat (braun) gefärbt wurden. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt (blaue Zellkerne).

3.3.6 Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in 6.5⁺ CD4⁺ CD25⁺ und 6.5⁺ CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen

Es ist bekannt, dass CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen immunpathogene Mechanismen kontrollieren können (Jordan *et al.*, 2001; Apostolou *et al.*, 2002). Da in doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen keine akute Inflammation im Darm beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage ob CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen an der Toleranzinduktion in diesen Mäusen beteiligt sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden Lymphozyten aus den MLN von Villin-HA x TCR-HA und TCR-HA Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen 6.5, CD4 und CD25 markiert. Am MoFlo-Sorter wurden 6.5⁺ CD4⁺ CD25⁺ und 6.5⁺ CD4⁺ CD25⁻ T-Zellpopulation voneinander getrennt und sortiert. Aus den vier sortierten T-Zellsubpopulationen wurde RNA isoliert und in gleichen Mengen zu cDNA umgeschrieben. Mit der quantitativen Real Time PCR wurde die mRNA Expression von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und immunregulatorischen Molekülen bestimmt. In Abb. 3-16 sind die Expressionsdaten für die vier sortierten T-Zellsubpopulationen vergleichend dargestellt, die Expression der analysierten Gene wurde in CD25⁻ T-Zellen aus TCR-HA Mäusen gleich 1 und die Regulation der anderen T-Zellpopulationen dazu im entsprechenden Verhältnis angegeben.

Für die T_H1-assoziierten Zytokine TNF- α und IFN- γ wurden keine signifikanten Unterschiede in den T-Zellsubpopulationen gemessen, in keiner T-Zellsubpopulation war die Expression des Gens um einen Faktor von mehr als zwei reguliert. Auch der zur Auslösung einer T_H1-Immunantwort benötigte Transkriptionsfaktor T-Bet (Szabo *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001) war nur geringfügig mit einem Faktor von -1,8 und -2,0 in CD25-positiven T-Zellen von TCR-HA und doppelt-transgenen Mäusen herunterreguliert. Da sowohl TCR-HA Mäuse als auch Villin-HA x TCR-HA Mäuse diese Regulation aufwiesen, korrelierte dies aber nicht mit der Transgenexpression von HA in den Enterozyten.

Ebenso wurden keine wesentlichen Unterschiede für die Expression des T_H2-assoziierten Zytokins IL-4 nachgewiesen. Allerdings zeigte der Transkriptionsfaktor GATA-3, der eine T_H2-Immunantwort induziert und T_H1-Antworten über eine negative Regulation des Transkriptionsfaktors STAT-4 inhibiert (Zheng und Flavell, 1998; Usui *et al.*, 2003), in CD25⁺ T-Zellen von doppelt-transgenen Mäusen eine 2,9-fach gesteigerte Expression. Für die Expression der Gene, die dem immunregulatorischen

Spektrum zugeordnet werden können, waren im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen, insbesondere für die CD25-negativen T-Zellen, deutliche Unterschiede nachweisbar. Die Expression von FoxP3 war in $6.5^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ T-Zellen und $6.5^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ T-Zellen aus Villin-HA x TCR-HA Mäusen um einen Faktor von 2,6 bzw. 3,0 gesteigert, allerdings wiesen auch CD25-positive T-Zellen aus TCR-HA Mäusen eine 2,5-fach gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors auf. Ebenso wurde der Rezeptor PD-1 verstärkt in CD25-negativen T-Zellen von Villin-HA x TCR-HA Mäusen exprimiert.

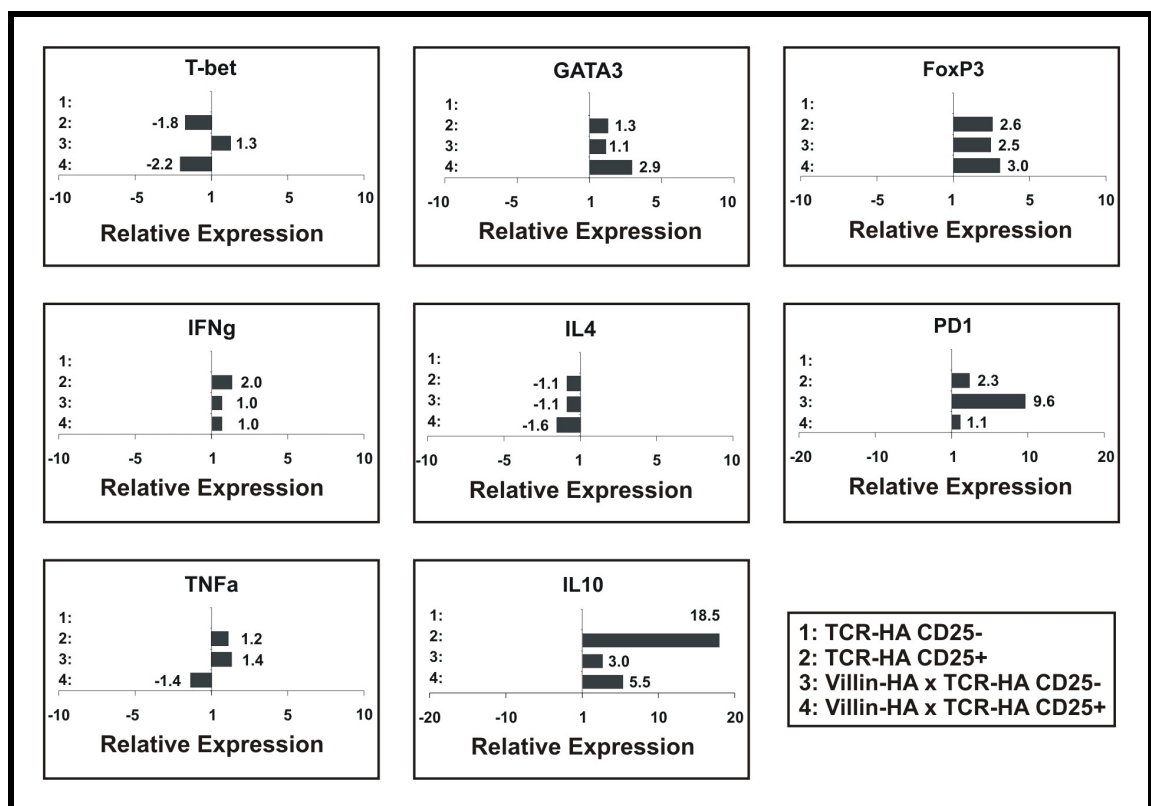


Abb. 3-16: Relative Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in $6.5^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ und $6.5^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ T-Zellen

Aus 8 bis 12 Wochen alten TCR-HA Mäusen, Villin-HA x TCR-HA Mäusen wurden die MLN Lymphozyten isoliert und mit Antikörpern gegen den transgenen TCR (6.5), CD4 und CD25 markiert. Am Durchflusszytometer wurden jeweils $6.5^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ und $6.5^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ T-Zellsubpopulationen sortiert und Zellen, die diese Bedingungen nicht erfüllten, verworfen. Die sortierten Subpopulationen wurden in cDNA umgeschrieben und 20ng cDNA der entsprechenden Proben wurden für die quantitative Real Time PCR mit 40 Amplifikationszyklen eingesetzt. Die Expression der mRNA der acht angegebenen Gene wurde mit zuvor etablierten spezifischen Primerpaaren nachgewiesen. In Abb. 3-16 wurden die relativen Werte für die mRNA-Expression der entsprechenden Gene der sortierten T-Zellsubpopulationen miteinander verglichen (1: TCR-HA CD25⁻, 2: TCR-HA CD25⁺, 3: Villin-HA x TCR-HA CD25⁻ und 4: Villin-HA x TCR-HA CD25⁺). Der Wert für die mRNA Expression in TCR-HA CD25-negativen Zellen wurde gleich 1 gesetzt, die Werte der anderen Subpopulationen wurden als Maß für die Regulation der entsprechenden Gene im relativen Verhältnis zu diesem Wert angegeben. Positive Zahlenwerte stellen eine verstärkte, negative Zahlenwerte eine verringerte Expression im Vergleich zur TCR-HA CD25- Ausgangspopulation dar.

Gegenüber CD25-negativen T-Zellen aus TCR-HA Mäusen konnte eine 9,6-fach gesteigerte Expression gemessen werden, zwischen CD25-positiven T-Zellen war dieser Unterschied deutlich niedriger. Die Expression des immunregulatorischen Zytokins IL-10 war in CD25-negativen T-Zellen aus Villin-HA x TCR-HA Mäusen um das Dreifache gesteigert. Allerdings zeigten CD25-positive T-Zellen aus TCR-HA Mäusen im Vergleich zu CD25-negativen T-Zellen eine 18-fach gesteigerte Expression, dagegen wiesen CD25-positive T-Zellen aus doppelt-transgenen Mäusen eine nur 5,5-fach gesteigerte Expression auf. Diese Daten legen nahe, dass regulatorische T Zellen in den MLN von doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen induziert wurden.

3.4 Autoimmunes Villin-HA x CL4-TCR Modell

Auch im doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Modell stand die Frage im Mittelpunkt, ob die Anwesenheit enterozytenspezifischer CD8-positiver T-Zellen zur Auslösung einer Entzündung im Darm oder aber zu einer Toleranzinduktion führt. Des weiteren konnten durch den Aufbau beider doppelt-transgener Modelle die Auswirkungen autoreaktiver MHC Klasse-II-restringierter CD4⁺ T-Zellen und MHC Klasse-I-restringierter CD8⁺ T-Zellen auf die enterozytenspezifische Expression des HA-Proteins miteinander verglichen werden. In zwei bereits bestehenden Modellen, in denen transgene CL4-TCR T-Zellen in HA-transgene Mäuse eingekreuzt wurden, betrug die Penetranz der ausgelösten Erkrankung jeweils 100% (Morgan *et al.*, 1996; Cornet *et al.*, 2001, s. Kap 1.5.4). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass der Verlauf der Erkrankung im Villin-HA x CL4-TCR Modell einen aggressiveren Verlauf nehmen würde als im Villin-HA x TCR-HA Modell. Daher wurden transgene Villin-HA Mäuse mit CL4-TCR transgenen Mäusen gekreuzt, die einen $\alpha:\beta$ -TCR exprimieren, der das MHC Klasse-I-restringierte Epitop HA₅₁₂₋₅₂₃ erkennt. Wie im Villin-HA x TCR-HA Modell wurden 8 bis 12 Wochen alte Villin-HA Mäuse der Linie 2 verwendet, die für mindestens fünf Generationen auf einen BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt worden waren.

3.4.1 Letale ulzerative Enterocolitis in Villin-HA x CL4-TCR transgenen Mäusen

Im Gegensatz zu Villin-HA Mäusen, die das HA Modellantigen in enterischen Gliazellen exprimierten (Morgan *et al.*, 1996), zeigten doppelt-transgene Villin-HA x CL4-TCR Mäuse nach ihrer Geburt keine Anzeichen einer akuten nekrotischen Enterocolitis und verstarben auch nicht. Allerdings starben zwei von acht beobachteten doppelt transgenen Villin-HA x CL4-TCR in einem Alter von 91 und 102 Tagen, während keines der Kontrolltiere verstarb. Beide Mäuse wiesen einen Darmvorfall (rektaler Prolaps) auf (Abb. 3-17A, links). Eine komplette Autopsie, und die histologische Analyse von Darmbiopsien der Mäuse erbrachte, dass beide Mäuse aufgrund einer diffusen Enterocolitis mit großflächigen Ulzerationen verstarben (Abb. 3-17A, rechts), in anderen Organen waren hingegen keine Läsionen zu beobachten.

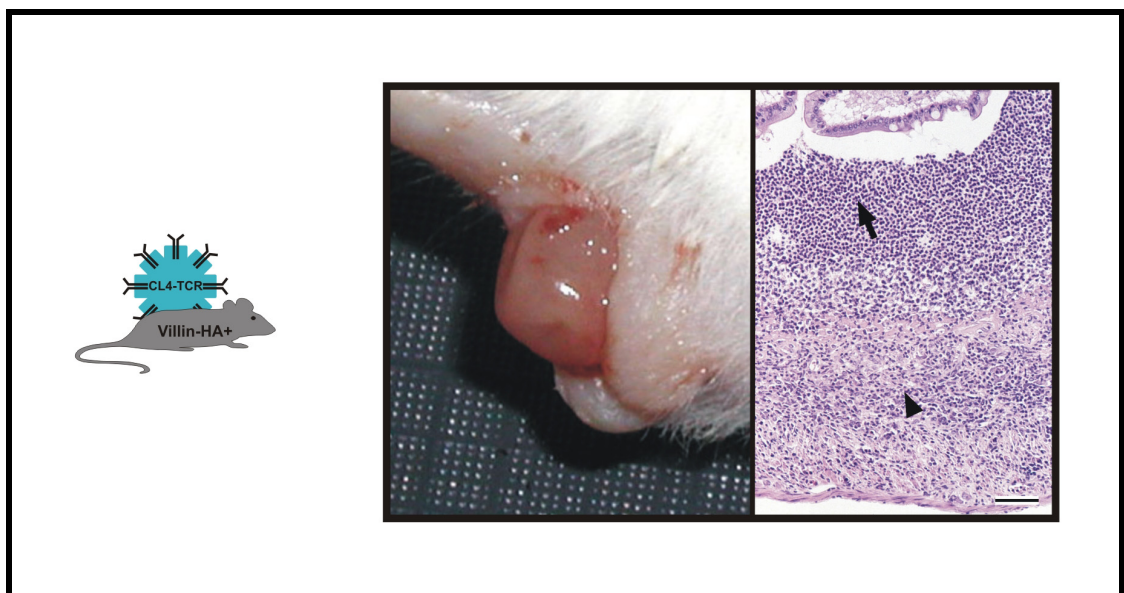


Abb. 3-17: Ulzerative Enterocolitis in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen

Einige doppelt-transgene Villin-HA x CL4-TCR Individuen entwickelten innerhalb von 12 bis 16 Wochen nach ihrer Geburt eine letale ulzerative Enterocolitis. Im linken Photo ist ein Rektalprolaps einer verstorbenen Villin-HA x CL4-TCR doppelt-transgenen Maus, im rechten Photo ist eine Immunhistochemie einer Paraffin-eingebetteten Darmbiopsie abgebildet. Die Lamina propria in diesen Mäusen war von sehr vielen neutrophilen Granulozyten infiltriert (Pfeil), die auch die Lamina submucosa und Lamina muscularis infiltrierten (Pfeilkopf). Der Maßstab des Photos beträgt 120µm.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass eine unerkannte systemische Infektion für den Tod der Mäuse verantwortlich war, wurden Stuhlbiopsien der Mäuse einer weitgehenden mikrobiologischen Untersuchung unterzogen, um pathogene Bakterien,

Viren, Pilze und Parasiten zu identifizieren.¹⁶ Bei den durchgeführten Untersuchungen konnten keine pathogenen Organismen in den klinischen Proben detektiert werden.

3.4.2 Zentrale Toleranz im Thymus von Villin-HA x CL4-TCR Mäusen

Um zu untersuchen, ob autoreaktive T-Zellen von doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen im Thymus deletiert werden, wurden Thymozyten aus doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen sowie aus Villin-HA und CL4-TCR Kontrollmäusen isoliert, mit CD4-, CD8- und V β 8-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch vermessen (Abb. 3-18). Villin-HA Mäuse werden in der oberen, doppelt-transgene Villin-HA x TCR-HA Mäuse in der mittleren und CL4-TCR transgene Mäuse in der unteren Reihe dargestellt. Die zusätzliche Analyse von Villin-HA Mäusen war notwendig, weil der V β 8-spezifische Antikörper im Gegensatz zum 6.5-Antikörper bei TCR-HA Mäusen nicht den spezifischen transgenen TCR, sondern die auch in endogenen T-Zellen exprimierte V β 8-Kette erkannte. Folglich sollte in Villin-HA Mäusen das endogene Repertoire an V β 8-positiven T-Zellen bestimmt werden. Die Prozentzahlen für doppelt-negative (CD4⁻ CD8⁻), doppelt-positive (CD4⁺ CD8⁺), CD4⁺ und CD8⁺ Thymozyten in CL4-TCR x Villin-HA Mäusen waren denen aus CL4-TCR Mäusen ähnlich. Im Vergleich zu Villin-HA Mäusen war aber in doppelt-transgenen und CL4-TCR transgenen Mäusen der Anteil an doppelt-positiven T-Zellen erniedrigt (72% und 77% im Vergleich zu 86%) und der Anteil CD8⁺ T-Zellen erhöht (15% und 13% im Vergleich zu 3%), was auf die bevorzugte Selektion des transgenen TCR zurückzuführen war.

Die Prozentwerte der V β 8⁺ Thymozyten waren in der CD4⁻ CD8⁺ Subpopulation mit 91% in doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu 96% in CL4-TCR transgenen Mäusen nur geringfügig reduziert. In nicht-transgenen Mäusen wiesen 21% der CD8⁺ T-Zellen eine endogene V β 8-Kette auf. Für die CD4⁺ CD8⁻ Subpopulation wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt, nur waren die Prozentwerte V β 8-positiver T-Zellen mit 68% und 75% im Vergleich zur CD4⁻ CD8⁺ Subpopulation geringer. Der Prozentsatz doppelt-positiver V β 8⁺ Thymozyten war in doppelt-transgenen Mäusen mit 33% um

¹⁶ Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med Florian Gunzer an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

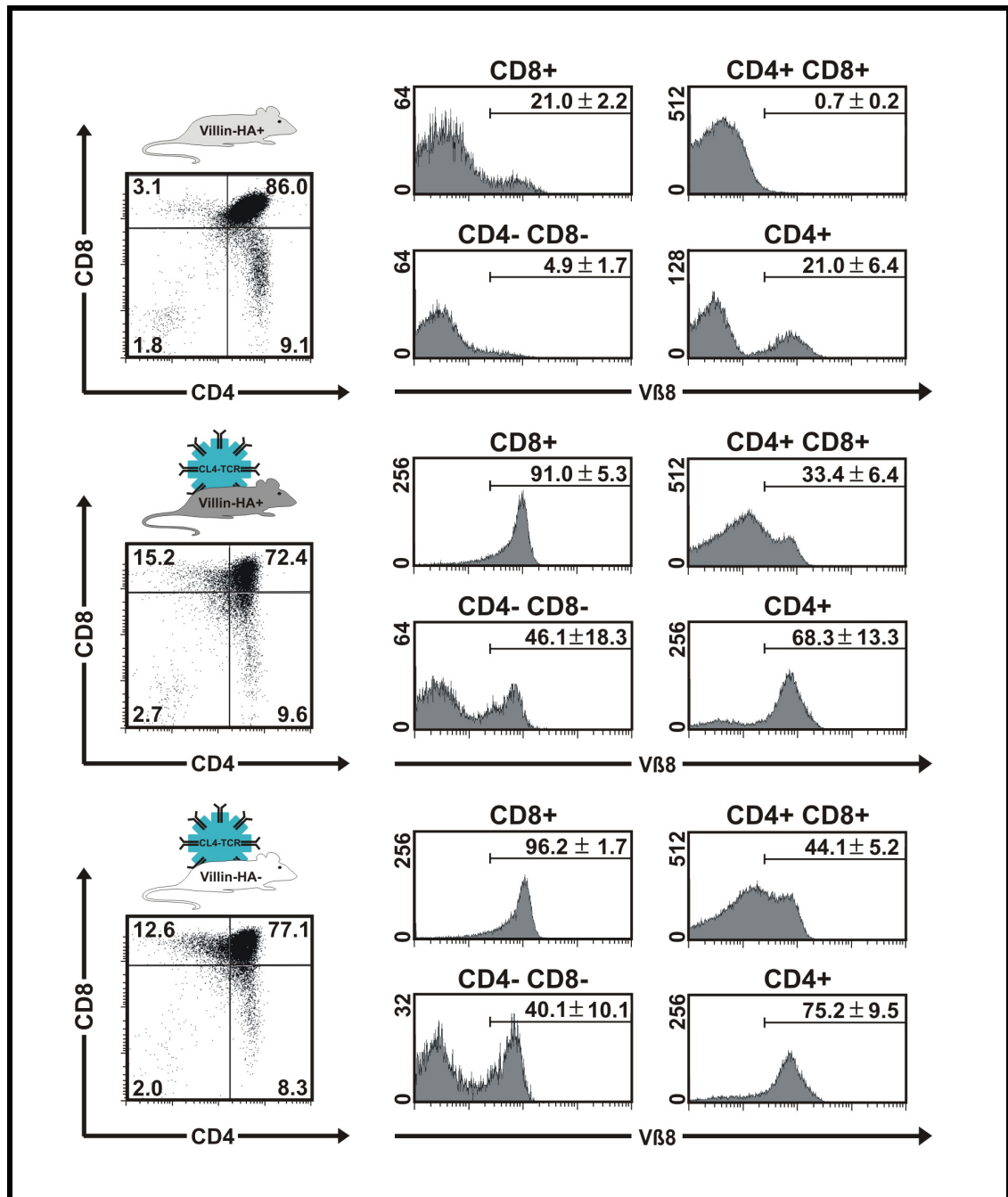


Abb. 3-18: Zentrale Toleranz und Entwicklung von Vβ8⁺ CD8⁺ Lymphozyten im Thymus

Transgene Villin-HA Mäuse (obere Reihe), doppelt-transgene Villin-HA x CL4-TCR Mäuse (mittlere Reihe) und CL4-TCR transgene Mäuse (untere Reihe) wurden in einem Alter zwischen 8 und 12 Wochen geopfert. Die isolierten Thymozyten wurden mit CD4-, CD8- und Vβ8-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch vermessen. Die Dot Plots zeigen die gemessenen Prozentwerte der sich entwickelnden CD4⁻CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Die Zellen dieser Subpopulationen (eingefügter Quadrant Marker) wurden hinsichtlich ihrer Expression der transgenen Vβ8-Kette des TCR in Histogrammen analysiert. Die Histogrammmarker geben die Prozentzahlen Vβ8-positiver T-Zellen in den entsprechenden Subpopulationen an. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

ein Viertel im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen mit 44% reduziert. In Villin-HA transgene Mäuse exprimierten nur 1% der T-Zellen der CD4⁺ CD8⁺ Subpopulation eine

endogene V β 8-Kette. In der CD4⁻ CD8⁻ Subpopulation waren die Prozentwerte V β 8⁺ T-Zellen bei doppelt-transgenen und CL4-TCR transgenen Mäusen ähnlich, 46% und 40% der T-Zellen exprimierten die V β 8-Kette. In endogenen T-Zellen von Villin-HA Mäusen betrug dieser Anteil nur 5%. Diese Ergebnisse zeigen, dass V β 8⁺ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen nur einer geringfügigen negativen Deletion im Thymus ausgesetzt waren, weniger als 10% der autoreaktiven transgenen T-Zellen wurden im Thymus deletiert.

3.4.3 V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen Villin-HA x CL4-TCR transgener Mäuse

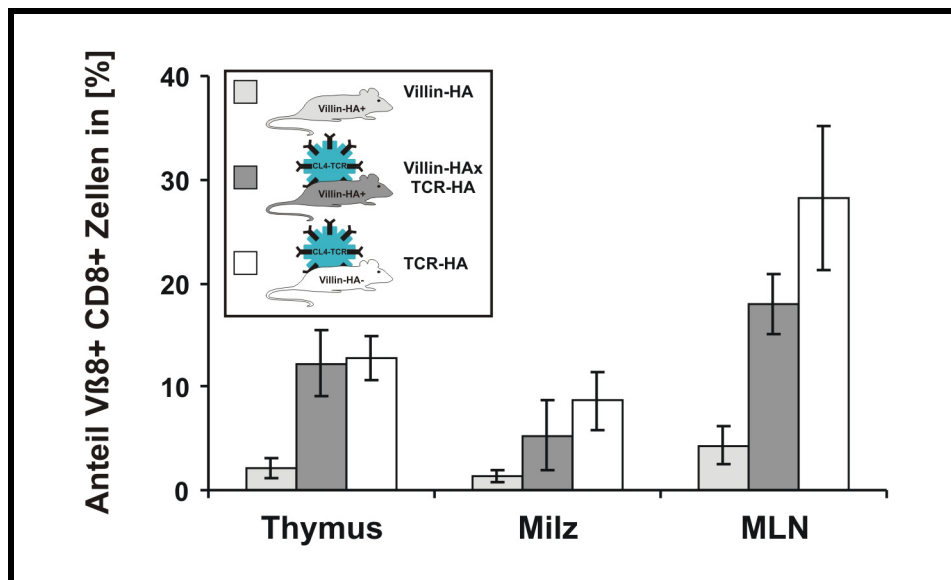


Abb. 3-19: Anteil V β 8⁺ CD8⁺ transgener T-Zellen in lymphatischen Organen
 Anteil V β 8⁺ CD8⁺ transgener T-Zellen in den lymphatischen Organen. Der Anteil V β 8⁺ CD8⁺ transgener T-Zellen wurde durchflusszytometrisch im Thymus, in der Milz und den MLN für Villin-HA transgene (hellgrau), doppelt-transgene Villin-HA x CL4-TCR (grau) und TCR-HA transgene Mäuse (weiß) bestimmt und im Balkendiagramm miteinander verglichen. CL4-TCR transgene Mäuse sind durch blaue T-Zellen an den Mäusen symbolisiert. Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse aus vier vermessenen Mäusen mit ihren Standardabweichungen.

In Analogie zum Villin-HA x TCR-HA Modell wurden die Anteile V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen im Thymus, in den MLN und in der Milz von Villin-HA (hellgrau), doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen (dunkelgrau) und CL4-TCR Mäusen (weiß) durchflusszytometrisch bestimmt. Abb. 3-19 zeigt die Prozentzahlen transgener T-Zellen in einem Balkendiagramm. Die prozentualen Anteile V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen im Thymus von doppelt-transgenen Mäusen waren mit $12,3 \pm 3,2\%$ nahezu identisch mit dem von CL4-TCR Mäusen mit $12,7 \pm 2,1\%$. In Villin-HA Mäusen waren $2,1 \pm 1,0\%$

der endogenen T-Zellen V β 8-positiv. In der Milz von Villin-HA x CL4-TCR Mäusen war der prozentuale Anteil an V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen um ca. 40% verringert, in doppelt-transgenen Mäusen betrug der Anteil an V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen $5,3 \pm 3,5$ % und in CL4-TCR Mäusen $8,6 \pm 2,8$ %. Im Vergleich dazu betrug der Anteil endogener V β 8-positiver T-Zellen in Villin-HA Mäusen $1,3 \pm 0,6$ %. In den MLN betrug die Reduktion V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen ebenfalls ca. 40%, in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen wurden $17,9 \pm 1,8$ % und in CL4-TCR Mäusen $28,2 \pm 7,0$ % V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen gemessen, in Villin-HA Mäusen betrug der Anteil endogener V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen $4,3 \pm 1,8$ %.

3.4.4 Aktivierung von V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen

V β 8⁺ CD8⁺ T Zellen aus Villin-HA x CL4-TCR- wurden hinsichtlich ihrer Expression von Aktivierungsmarkern analysiert, dazu wurden Lymphozyten aus den MLN isoliert und mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene V β 8, CD8 und CD25, CD62L und CD69 markiert. Die Expressionsprofile von Villin-HA x CL4-TCR (dicke Linien) und CL4-TCR Mäusen (dünne Linien) wurden durchflusszytometrisch gemessen und in Histogrammen miteinander verglichen (Abb. 3-20). Die prozentualen Anteile der T-Zellen für Villin-HA x TCR-HA Mäuse und TCR-HA Mäusen werden über und unter den eingefügten Histogrammarkern angegeben.

In den MLN von Villin-HA x CL4-TCR Mäusen exprimierten 1,9% der HA-spezifischen T-Zellen den IL-2 Rezeptor (CD25) und 54% zeigten keine Expression von L-Selektin (CD62L), im Vergleich dazu ergaben sich für CL4-TCR Mäuse 1,1% CD25-positiv und 58% CD62L-negative V β 8⁺ CD8⁺ T-Zellen. Ausschließlich der Anteil CD69-positiver T-Zellen war in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen mit 14% gegenüber 7% in CL4-TCR Mäusen geringfügig erhöht. Für die gemessenen Aktivierungsantigene auf der Oberfläche von V β 8⁺ CD8⁺ T Zellen ergaben sich folglich keine größeren Unterschiede hinsichtlich ihrer Aktivierung, ebenso waren in V β 8⁺ CD8⁺ T Zellen aus der Milz von doppelt-transgenen und CL4-TCR Mäusen keine Unterschiede nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

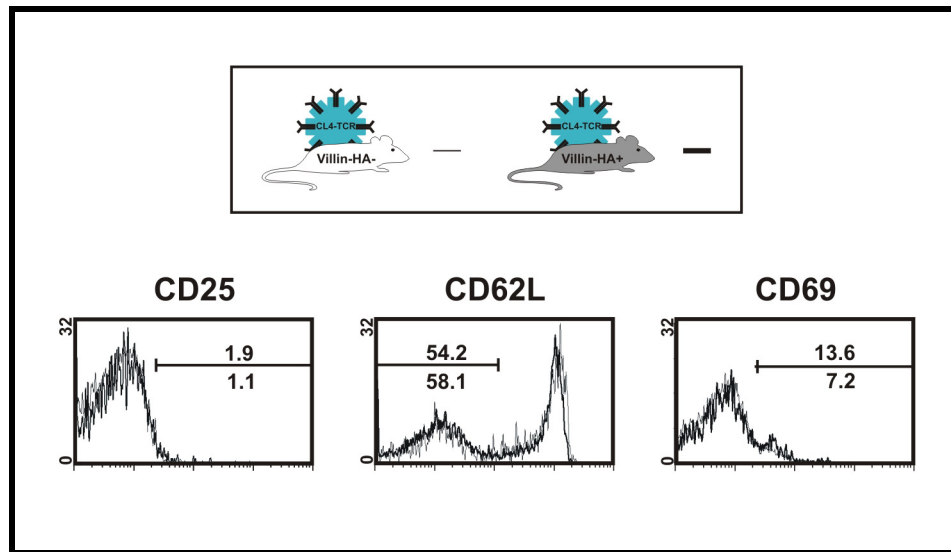


Abb. 3-20: Aktivierung von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen

T-Zellen wurden aus den MLN von CL4-TCR transgenen und von Villin-HA x CL4-TCR transgenen Mäusen isoliert. Die Zellen wurden mit $V\beta 8$ - und $CD8$ -Antikörpern und zusätzlich mit Antikörpern gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD62L und CD69 markiert. Im Durchflusszytometer wurden $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen selektiert und auf die Expression der angegebenen Aktivierungsmarker in Histogrammen analysiert. Daten von CL4-TCR transgenen Mäusen sind als dünne, Daten von Villin-HA x CL4-TCR transgenen Mäusen durch dicke Linien gekennzeichnet. Ein Histogrammmarker wurde eingefügt, um die Prozentzahlen aktivierter T-Zellen für die angegebenen Oberflächenmarker zu bestimmen. Die Prozentzahlen von Villin-HA x CL4-TCR und CL4-TCR Mäusen sind über und unter der Markerregion angegeben. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

3.4.5 Nachweis $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen mit HA-spezifischen MHC Klasse-I-Tetrameren

Da $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen keine spezifische Aktivierung aufwiesen, sollte mit Hilfe von HA-spezifischen MHC Klasse-I-Tetrameren die Expression des transgenen TCR auf der Oberfläche von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen überprüft werden. Dazu wurden Lymphozyten aus den MLN isoliert. Die Zellen wurden mit $CD8$ -Antikörpern und mit Tetrameren oder mit $V\beta 8$ -Antikörpern markiert und am Durchflusszytometer analysiert, die Ergebnisse der Tetramerfärbungen (obere Reihe) und $V\beta 8$ -Färbungen (untere Reihe) sind in „Dot-plots“ dargestellt (Abb. 3-21). Der Gehalt an $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen betrug für das dargestellte Experiment 12% für die MLN in doppelt-transgenen und 31% in CL4-TCR Mäusen. Villin-HA transgene Mäuse wiesen nur einen Anteil an endogenen $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen von 5% auf. Gemäß dieser Messung, waren demnach transgene T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen vorhanden, diese zeigten aber keine Bindung von HA-spezifischen MHC Klasse-I-Tetrameren

(0,2%). Dagegen war für 13% der $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen eine Bindung von Tetrameren nachweisbar, wobei der tatsächliche Anteil Tetramer-bindender T-Zellen durch die schwache Phycoerythrin-Immunfluoreszenz der verwendeten Tetramere noch unterschätzt werden dürfte. In Villin-HA Mäusen war ebenfalls keine Bindung von Tetrameren an $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachweisbar. Folglich war der transgene TCR auf der Oberfläche von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen aufgrund einer Aktivierung herunterreguliert worden. Für Splenozyten aus doppelt-transgenen und CL4-TCR transgenen Mäusen ergaben sich ähnliche Resultate.

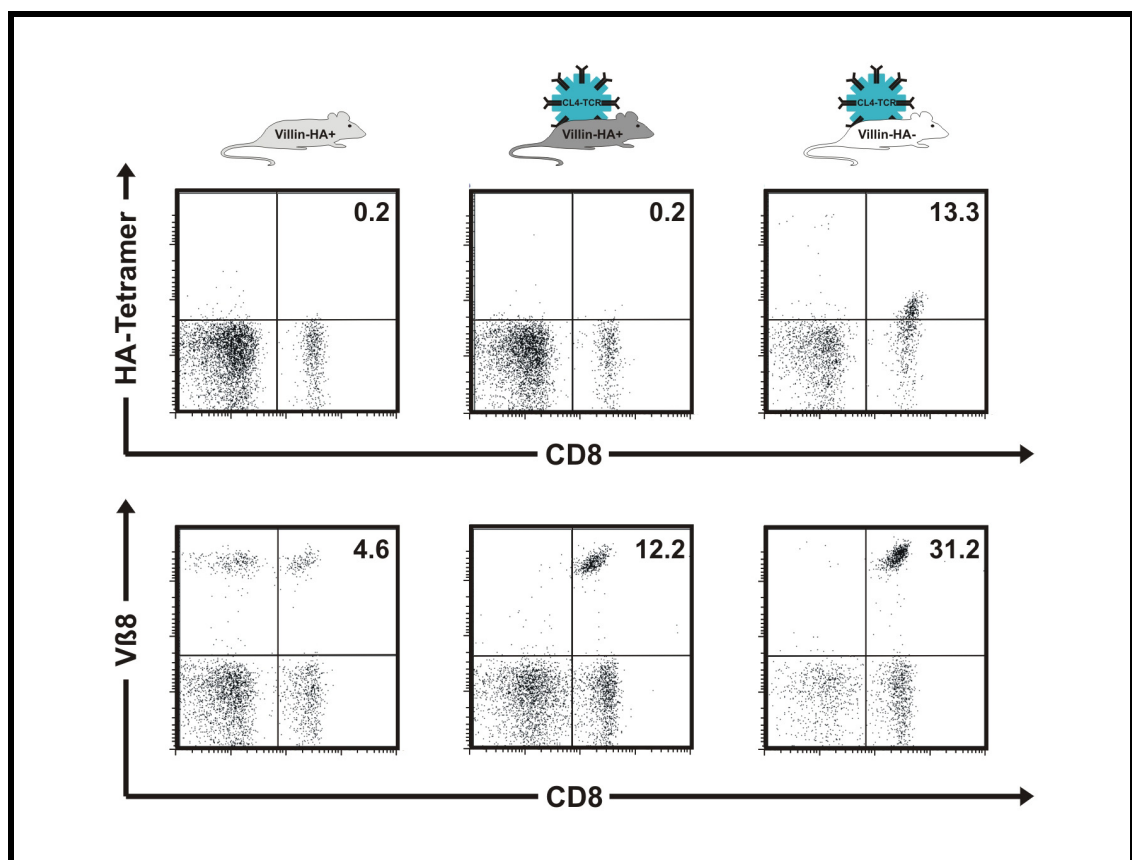


Abb. 3-21: Nachweis HA-spezifischer T-Zellen mit HA-spezifischen Tetrameren in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen

T-Zellen wurden aus den MLN von Villin-HA transgenen, Villin-HA x CL4-TCR doppelt-transgenen Mäusen und CL4-TCR transgenen Mäusen isoliert. Die Zellen wurden mit Vβ8- und CD8-Antikörpern oder mit Tetrameren und CD8-Antikörpern markiert. Im Durchflusszytometer wurde der Anteil an $V\beta 8^+$ $CD8^+$ und Tetramer⁺ $CD8^+$ T-Zellen in Dot Plots bestimmt. Die Prozentzahlen der doppelt-positiven Zellen sind jeweils im rechten oberen Quadranten angegeben. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

3.4.6 In-vitro Proliferation von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen

In Analogie zum TCR-HA x Villin-HA Modell wurden $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus Villin-HA x CL4-TCR Mäusen untersucht, um zu klären, ob die T-Zellen in doppelt-

transgenen Mäusen funktionell oder aber anerg waren. Dazu wurden T-Zellen aus den Milzen von Villin-HA, CL4-TCR und doppelt-transgenen Geschwistertieren isoliert und für *in-vitro* Antigenstimulationsexperimente benutzt. Abb. 3-22 zeigt ein Vorexperiment, bei dem die Bedingungen für eine Antigenstimulation von $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen ausgetestet werden sollten. Dazu wurden die T-Zellen mit 1, 3 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ des spezifischen MHC Klasse-I-restringierten HA-Peptids IYSTVASSLVL stimuliert, nach 3 Tagen wurde der Einbau von ^3H -Thymidin am Szintillator gemessen. Es zeigte sich, dass $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen aus transgenen CL4-TCR Mäusen sehr stark in Gegenwart ihres spezifischen Antigens proliferierten, da ein hoher Einbau von ^3H -Thymidin mit ca. $2,7 \cdot 10^5$ cpm gemessen wurde. Hingegen zeigten $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen aus Villin-HA x CL4-TCR Mäusen mit ca. $1,0 \cdot 10^5$ cpm eine im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen deutlich verringerte Proliferation. Nicht HA-spezifische $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen aus Villin-HA Mäusen zeigten keine Proliferation. Gleiche Resultate wurden in Lymphozyten aus $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen aus Villin-HA x CL4-TCR Mäusen gemessen. Die Bedingungen der Antigenstimulation im Vorexperiment waren suboptimal. Eine mikroskopische Kontrolle der im Experiment eingesetzten T-Zellpopulationen in den Mikrotiterplatten ergab, dass schon 2 Tage nach Beginn des Experimentes „wells“ mit Lymphozyten aus doppelt-transgenen Mäusen von blastären proliferierenden Lymphozyten überwachsen waren. Deshalb wurde die Dauer der Antigenstimulation für weitere Experimente auf 48h reduziert. Außerdem zeigte der Einbau an ^3H -Thymidin in $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen, dass schon bei 1 $\mu\text{g/ml}$ die maximale Stimulationskapazität erreicht worden war. Offensichtlich reagierte der transgene TCR von CL4-TCR Mäusen sehr viel empfindlicher auf die Gegenwart seines spezifischen Antigens als der transgene TCR bei TCR-HA Mäusen, bei denen die zur Stimulation notwendigen Peptidkonzentrationen deutlich höher waren. Folglich wurden für weitere Antigenstimulationsexperimente die eingesetzten Konzentrationen des HA-Peptids verringert. Um die Kapazität transgener $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen zur Proliferation direkt miteinander zu vergleichen, wurden aus den Milzen von Villin-HA, CL4-TCR und doppelt-transgenen Geschwistertieren die Lymphozyten isoliert, mit $V\beta 8$ - und $CD8$ -Antikörpern markiert und am MoFlo-Sorter sortiert (Abb. 3-23A). Jeweils $2 \cdot 10^4$ $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen wurden gemeinsam mit $5 \cdot 10^5$ BALB/c Splenozyten als APC für die Antigenstimulationsexperimente eingesetzt.

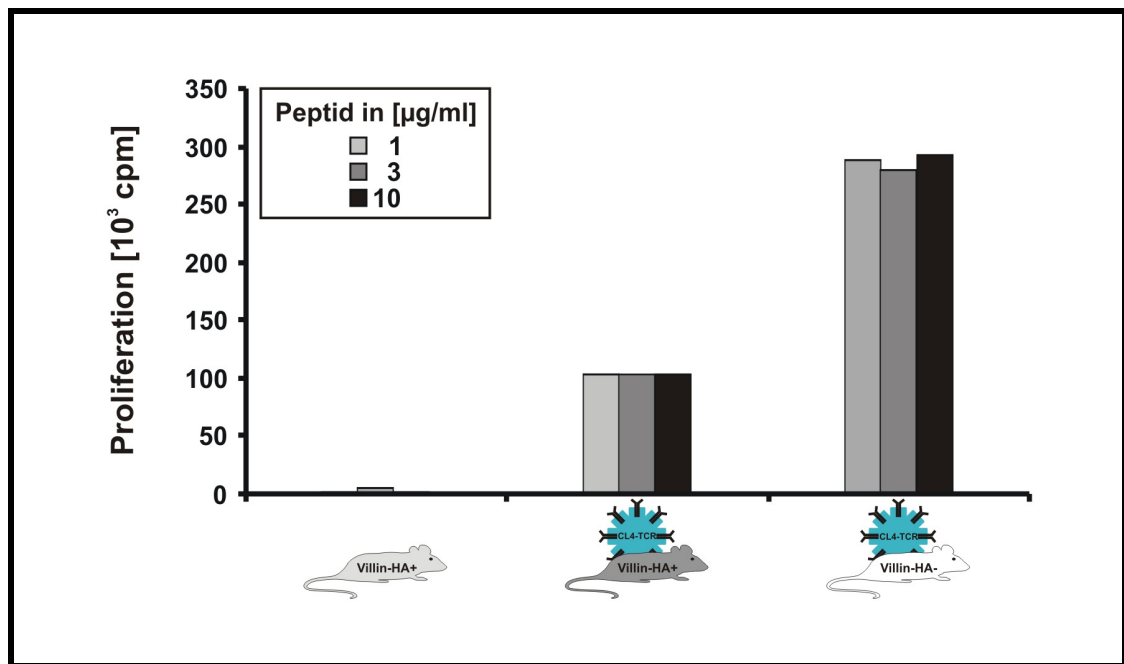


Abb. 3-22: Antigenstimulationsversuche mit $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen

Für Antigenstimulationsexperimente wurden Villin-HA transgene, CL4-TCR transgene und Villin-HA x CL4-TCR doppelt-transgene Mäuse in einem Alter von 8 bis 12 Wochen geopfert und die Splenozyten aus der Milz isoliert. $5 \cdot 10^5$ Splenozyten wurden pro well in einer 96-well Mikrotiterplatte in 200 µl Medium in Triplikaten ausgesät. Die Lymphozyten wurden mit 1, 3 oder 10 µg/ml HA-Peptid (IYSTVASSLV) stimuliert und für 72 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit ^3H -Thymidin gepulst, anschließend geerntet und der Einbau an ^3H -Thymidin am Szintillator vermessen. Die Diagramme stellen den Einbau an ^3H -Thymidin in den jeweiligen Lymphozytenpopulationen in [10^3 cpm] dar.

Die T-Zellen wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von HA-Peptid (0,05, 0,3, 1,0 µg/ml) stimuliert. Als zusätzliche Kontrollen wurden das irrelevante LLO- (Lysteriolysin O)-Kontrollpeptid (1 µg/ml) und das Mitogen Concavalin A (Con A; 0,8 µg/ml) verwendet. Das Peptid LLO wird wie das HA-Peptid auf H-2K^d MHC Klasse-I-Molekülen präsentiert, seine Verwendung als Negativkontrolle sollte die Möglichkeit ausschließen, dass $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in Gegenwart eines irrelevanten Peptids proliferierten. Con A stellt ein T-Zell-Mitogen dar, dass den TCR von den T-Zellen unspezifisch aktiviert und diente somit als Positivkontrolle. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 3-23B dargestellt.

$V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus den Milzen von Villin-HA, doppelt-transgenen und CL4-TCR Mäusen wiesen bei einer Stimulation ohne Peptid oder dem Kontrollpeptid LLO keine messbare Proliferation auf. $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus CL4-TCR Mäusen zeigten bei Stimulationen mit dem HA-Peptid einen starken Einbau an ^3H -Thymidin, die gemessenen Werte betrugen für alle drei verwendeten Peptidkonzentrationen ca. $1,0 \cdot 10^5$ cpm. Hingegen waren weder in Villin-HA Kontrollmäusen noch in doppelt-transgenen

Mäusen proliferierende $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachweisbar, ein Einbau an 3H -Thymidin in diesen T-Zellpopulationen war nicht messbar. Dennoch zeigten $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen sowohl aus CL4-TCR Mäusen als auch aus doppelt-transgenen und Villin-HA Kontrollmäusen einen Einbau an 3H -Thymidin, wenn sie mit dem Mitogen Con A stimuliert worden waren.

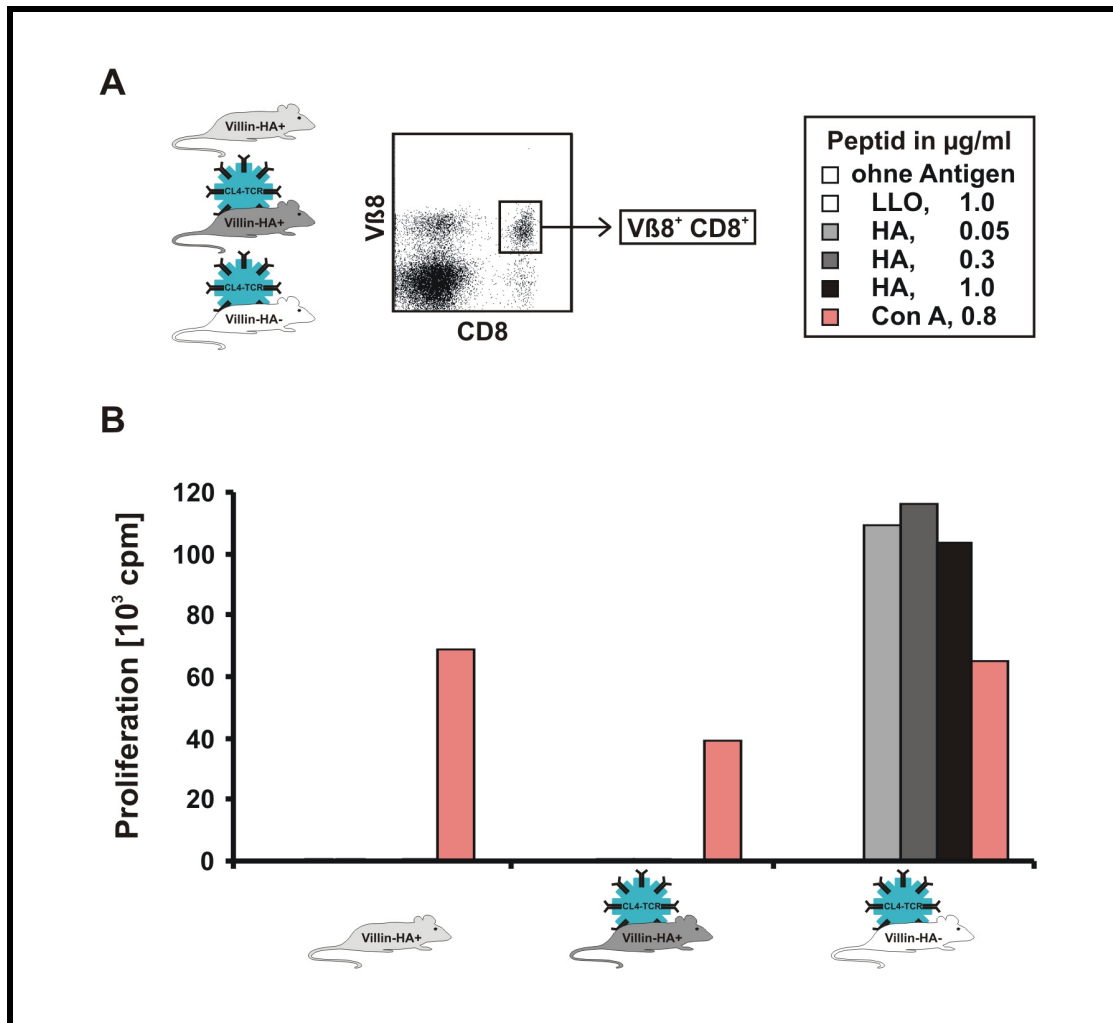


Abb. 3-23: Antigenstimulationsversuche mit sortierten $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen

A Versuchsschema. Villin-HA transgene, CL4-TCR transgene und Villin-HA x CL4-TCR doppelt-transgene Mäuse wurden in einem Alter von 8 bis 12 Wochen geopfert und die Splenozyten isoliert. Die Zellen wurden mit $V\beta 8$ - und $CD8$ -Antikörpern markiert und am MoFlo-Sorter wurden die $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen selektiert, die restlichen Zellen wurden verworfen. 20.000 $V\beta 8^+$ $CD8^+$ Responder T-Zellen wurden dann mit 500.000 bestrahlten Feeder-Zellen (3.000 rad) in Triplikaten ausgesät und mit $1.0 \mu g/ml$ Lysteriolysin (weiß), mit $0.8 \mu g/ml$ Concavalin A (rot), den angegebenen Konzentrationen an HA-Peptid (IYSTVASSLV, grau) oder ohne Antigen (weiß) stimuliert. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei $37^\circ C$ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit 3H -Thymidin gepulst, anschließend geerntet und der Einbau an 3H -Thymidin am Szintillator vermessen. B Versuchsdigramm. Das Diagramm stellt den Einbau an 3H -Thymidin in den jeweiligen Lymphozytenpopulationen der verwendeten transgenen Mäuse in $[10^3 \text{ cpm}]$ dar. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die gemessenen Werte für den Einbau betrugen hier ca. $0,7 \cdot 10^5$ cpm für Villin-HA Mäuse, $0,4 \cdot 10^5$ cpm für doppelt-transgene Mäuse und $0,7 \cdot 10^5$ cpm für CL4-TCR Mäuse. Da die spezifischen $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen nur in Gegenwart des Mitogens Con A proliferierten, nicht aber in Gegenwart ihres spezifischen Antigens, musste aus diesem Experiment der Schluss gezogen werden, dass die $V\beta 8^+$ $CD8^+$ HA-spezifischen T-Zellen in diesen Mäusen anergisiert worden waren.

3.4.7 Infiltration des Dünndarms von Villin-HA x CL4-TCR Mäusen durch $CD3^+$ Lymphozyten

In Hämatoxylin und Eosin gefärbten histologischen Schnitten des Ileums von doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR (\blacktriangle), Villin-HA (\bullet) und CL4-TCR-HA Mäusen (\blacksquare) wurden die Werte für LPL und IEL bestimmt (Abb. 3-24A). In den untersuchten Schnitten von doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen war ein Anstieg der IEL and LPL gegenüber CL4-TCR Mäusen in der intestinalen Mukosa von doppelt-transgenen Mäusen nachweisbar (Abb. 3-24A). Die Anzahl infiltrierender LPL in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen war mit $64,3 \pm 32,8$ auf 100 ausgezählte Enterozyten gegenüber CL4-TCR Mäusen mit $13,5 \pm 7,2$ auf 100 ausgezählte Enterozyten um ein Vierfaches erhöht. Im Vergleich dazu war die Anzahl infiltrierender IEL um ein Dreifaches erhöht, für doppelt-transgene Villin-HA x CL4-TCR Mäuse wurden $25,6 \pm 11,3$ auf 100 Enterozyten und für CL4-TCR transgene Mäusen $8,9 \pm 1,7$ auf 100 Enterozyten ausgezählt.

Abb. 3-24B zeigt einen Hämatoxylin und Eosin gefärbten histologischen Schnitt einer doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Maus (links) mit erhöhten Werten an infiltrierenden Lymphozyten im Vergleich mit einer CL4-TCR Maus (rechts). Trotz des engen Kontaktes zwischen HA-exprimierenden Enterozyten und infiltrierenden T-Zellen wurde keine Schädigung des intestinalen Epithels beobachtet. Ebenso waren keine auffälligen Veränderungen hinsichtlich der Anzahl, Größe und Struktur der Peyerschen Plaques nachweisbar. Zusätzlich wurde eine Immunhistochemie zum Nachweis von $CD3^+$ Lymphozyten durchgeführt (Bildausschnitte in Abb. 3-24B). In doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen wurde eine signifikante Erhöhung der infiltrierenden $CD3^+$ Lymphozyten im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen festgestellt.

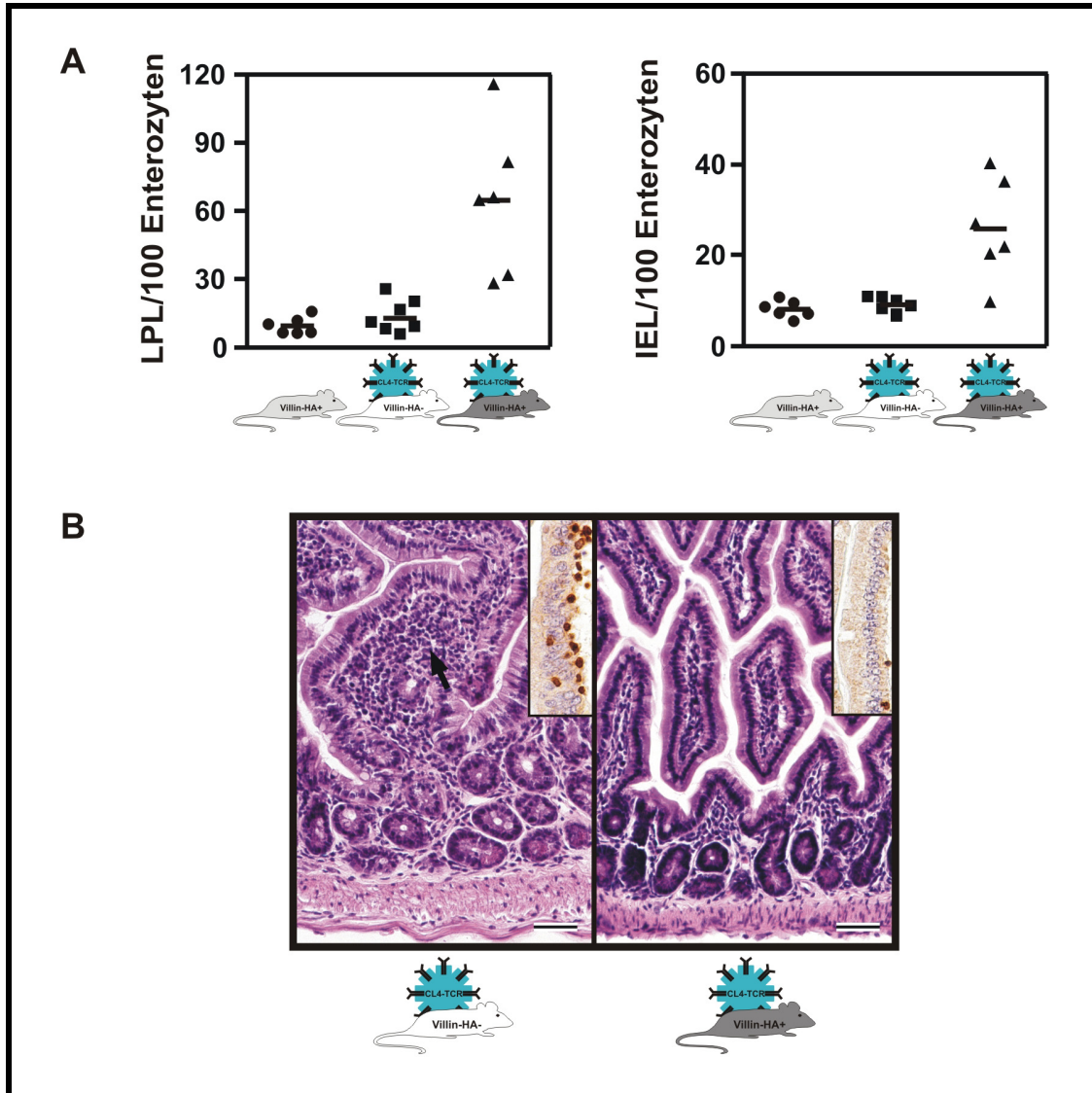


Abb. 3-24: Infiltration des Dünndarms durch Lymphozyten

A Infiltrierende Lymphozyten in der Lamina propria und im intestinalen Epithel. Aus 8 bis 12 Wochen alten Villin-HA transgenen (●), CL4-TCR transgenen (■) und Villin-HA x CL4-TCR doppelt-transgenen Mäusen (▲) wurden Darmbiopsien entnommen und histologische Paraffinschnitte angefertigt. Die infiltrierenden Lymphozyten der Lamina propria und des intestinalen Epithels wurden ausgezählt und über die im Bildausschnitt sichtbaren Epithelzellen normalisiert. Experimentgruppen bestanden jeweils aus 6 bis 7 Mäusen. Die Mittelwerte sind als Balken dargestellt. B Infiltration der Lamina propria durch Lymphozyten. Beide Photos zeigen Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte der Lamina propria. Links ist die Lamina propria einer Villin-HA x CL4-TCR transgenen Maus, rechts die Lamina propria einer CL4-TCR transgenen Geschwistermaus dargestellt. Der Pfeil verweist auf infiltrierende Lymphozyten. Die Maßstäbe in den Photos repräsentieren jeweils 100µm. Die Bildausschnitte rechts oben zeigen Paraffin-eingebettete Biopsien in einem Maßstab von 80µm, die mit α-CD3 Antikörpern und Diaminobenzidin als Substrat (braun) gefärbt wurden. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt (blaue Zellkerne).

4 Diskussion

Unangemessene T-Zellantworten gegenüber luminalen Antigenen sind sehr wahrscheinlich für die chronischen inflammatorischen Prozesse verantwortlich, die zu einer intestinalen Entzündung führen (Duchmann *et al.*, 1995; Rath *et al.*, 2001; s. auch Kap. 1.1.4). Studien in Mausmodellen und an Patienten haben gezeigt, dass CEDE einige Charakteristika von Autoimmunerkrankungen aufweisen, da Autoantikörper in Patienten detektiert wurden und autoimmune Mechanismen zur Erkrankung von Mäusen beitragen (Shanahan *et al.*, 1992; Mizoguchi *et al.*, 1996; Seibold *et al.*, 1998). Allerdings ist es schwierig, Selbstantigene zu identifizieren und nachzuweisen, die in der Ätiologie und bei der Chronizität von CEDE von Bedeutung sind. Ohne eine genaue Kenntnis der antigenen Determinante des Selbstantigens lassen sich die Auswirkungen einer autoimmun gerichteten Antigenspezifität jedoch nicht klären.

Um diese Situation zu überwinden wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene HA-transgene Mauslinien generiert. Villin-HA Mäuse exprimierten das transgene Autoantigen HA exklusiv im gesamten Darmepithel unter dem Villin-Promotor (Wilson *et al.*, 1981; Pinto *et al.*, 1999; Caton *et al.*, 1995). Daher wurden Villin-HA Mäuse dazu genutzt, Transfer- und Kreuzungsmodelle mit MHC Klasse-I- und Klasse-II-restringierten TCR-transgenen Mäusen aufzubauen, deren T-Zellen gegen das HA-Protein gerichtet sind (Kirberg *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1996). Das Transfermodell von 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in Villin-HA Mäusen diente vor allem dem Nachweis der Funktionalität des Modells. Die etablierten Villin-HA x CL4-TCR und Villin-HA x TCR-HA Kreuzungsmodelle erlaubten die Untersuchung einer autoimmun ausgelösten intestinalen Entzündung in doppelt-transgenen Mäusen und einen Vergleich der Mechanismen in beiden Modellen.

4.1 HA-transgene Mausmodelle

Die zentrale Zielstellung der Arbeit war zunächst die Generierung von transgenen Mäusen, die das HA-Protein des Influenza Virus A/PR/8/34 (Wilson *et al.*, 1981) exklusiv im Darm exprimieren sollten (s. Kap. 1.5.1). Zu Beginn der Arbeit war nicht absehbar, ob die Generierung der HA transgenen Mauslinien gelingen würde. Um das Risiko eines Misserfolges zu minimieren, wurden drei darmspezifische Promotoren zum Aufbau von drei verschiedenen Transgenkonstrukten verwendet. So wurde die

Wahrscheinlichkeit erhöht, dass zumindest eines der drei klonierten Vektorkonstrukte zur Generierung einer transgenen Mauslinie führt. Die verwendeten Promotoren wurden hinsichtlich ihrer in der Literatur angegeben spezifischen Expressionsaktivitäten im Darm ausgewählt. Während demnach der IFABP-Promotor (Green *et al.*, 1992) eine Expression im Dünndarm- und der FABPi-Promotor (Sweetser *et al.*, 1988) eine Expression im Dickdarmepithel ermöglicht, zeigt der Villin-HA-Promotor (Pinto *et al.*, 1999) eine Expressionsaktivität für das gesamte Darmepithel (s. Kap. 1.5.2). Ein weiteres Argument zur Generierung verschiedener HA-transgener Mauslinien bestand darin, dass die unterschiedliche Lokalisation der HA Expression einen Einfluss auf den Verlauf der Entzündung in den Transfermodellen und den doppelt-transgenen Mausmodellen ausüben könnte. Die verschiedenen generierten HA-transgenen Mauslinien wären somit hinsichtlich ihres Phänotyps bzw. ihrer Erkrankung vergleichbar.

Um eine erfolgreiche Expression des Transgens in Mäusen zu erreichen, mussten die verwendeten Vektorsequenzen bestimmte Anforderungen erfüllen. So enthielten alle generierten Konstrukte neben dem jeweiligen verwendeten Promotor und der kodierenden Sequenz des HA auch immer eine Polyadenylierungssequenz und eine Exon/Intronstruktur (Brinster *et al.*, 1985). Aus diesen Elementen wurden die drei in Abb. 3-1, Abb. 3-2 und Abb. 3-3 Konstrukte entsprechend den angegebenen Elementen konstruiert. Die Korrektheit der Konstrukte wurde jeweils mit Restriktionsverdauen und einer Sequenzierung der kodierenden HA-Sequenz überprüft.

Die HA-transgenen Mauslinien wurden mit Hilfe eine Pronukleusinjektion in befruchteten Eizellen erzeugt. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich 1 bis 200 Kopien einer Vektorsequenz in das Genom von Mäusen integrieren, wobei der Ort der Integration nicht vorhersagbar ist (Schenkel, 1995; Gordon und Ruddle, 1985).

Anfänglich durchgeführte Mikroinjektionen in die Oozyten von BALB/c-Mäusen waren vermutlich deshalb erfolglos, weil die Oozyten vom Inzuchtstamm BALB/c sehr fragil und auch die zu manipulierenden Eizellen im Vergleich zu anderen Mausstämmen kleiner sind. Aus diesem Grund wurden die Injektionen in Oozyten von widerstandsfähigeren (C57BL/6JxDBA/2) F1 Auszuchtmäusen vorgenommen, anschließend in die Eileiter scheinschwangerer Ammenmäuse eingebracht und ausgetragen. Aufgrund des falschen genetischen Hintergrundes mussten aber die generierten transgenen „Founder“-Mäuse auf den genetischen BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt werden, der eine korrekte Präsentation der beiden HA-Peptide

IYSTVASSLVLL und SSFERFEIFPK auf MHC Klasse-I- (H-2K^d:HA₅₁₂₋₅₂₃) und MHC Klasse-II- (H-2E^d: HA₁₁₀₋₁₂₀)-Restriktionselementen gewährleistet.

Tab. 4-1: Generierte HA-transgene Mauslinien

In der Tabelle werden die Expressionsdaten der verschiedenen generierten Mauslinien in einer Übersicht zusammengefasst und den Werten integrierter Transgenkopien gegenüber gestellt. Schwarz sind der Literatur nach zu erwartende Expressionsaktivitäten, rot sind unerwartete Expressionen gekennzeichnet. Die Abschätzung der integrierten Transgenkopien wurde anhand eines Vergleichs mit dem verwendeten Standard optisch vorgenommen.

Konstrukt	Mauslinie	geschätzte Kopienanzahl	Expression
 IFABP-HA	Linie 1	8	Duodenum (+++), Ileum (+), Colon (+)
	Linie 2	4	Jejunum (++), Ileum (++)
	Linie 3	4	Duodenum (+), Jejunum (+++), Ileum (+)
 FABPi-HA	Linie 1	>25	Duodenum (+++), Caecum (+++), Colon (+++), andere Organe (+++)
	Linie 2	5	Duodenum (+), Jejunum (+), Ileum (+), Niere (+), Herz (+), Lunge (+)
	Linie 3	10-12	Duodenum (++), Ileum (++), Caecum (+++), Colon (+++), Thymus (+++), Herz (+), Lunge (+), Leber (+)
 Villin-HA	Linie 1	1	Caecum (+++), Jejunum (+++), Duodenum (+++), Ileum (++), Colon (++), andere Organe (+)
	Linie 2	1	Caecum (+++), Jejunum (+++), Duodenum (++), Ileum (+++), Colon (+++)
	Linie 3	4	Caecum (+++), Jejunum (+++), Duodenum (++), Ileum (+++), Colon (+++), Niere (+)

Die Generierung transgener Mäuse erwies sich für alle drei injizierten Konstrukte als erfolgreich. Insgesamt wurden 5 IFABP-HA transgene, sieben FABPi-HA transgene und drei Villin-HA transgene „Founder“-Tiere detektiert, was zu einer Transgenintegration von ca. 5% der manipulierten Tiere führte. Da der Platz für die Haltung der Mäuse in der GBF begrenzt war, wurden jeweils drei der transgenen Tiere ausgewählt und mit BALB/c Mäusen als Begründer von HA-transgenen Mauslinien verpaart. Transgene Mäuse konnten aufgrund der in Abb. 3-4 dargestellten promotorspezifischen Primerpaare schnell und sicher detektiert werden. „Foundertiere“ und transgene Nachkommen wiesen mit Ausnahme der Transgenexpression keinen erkennbaren Phänotyp auf, in keinem Fall verstarben HA-transgene Mäuse an einer mit dem Phänotyp korrelierenden Entzündung bzw. Enterocolitis. Die transgenen Mauslinien wurden mit Southern Blots hinsichtlich der Anzahl integrierter Kopien der transgenen Konstrukte und mit RNA Expressionsanalysen hinsichtlich der Stärke und

Lokalisation der Expression (s. Abb. 3-5) analysiert. Diese Ergebnisse sind in Tab. 4-1 zusammengefasst.

4.1.1 IFABP-HA transgene Mauslinien

IFABP-HA transgene Mauslinien zeigten anhand ihrer Hybridisierungssignale (Abb. 3-1C) die Integration von ca. vier bis acht Transgenkopien und wiesen eine spezifische Expression von HA mRNA im Dünndarmepithel auf. Zwar zeigte die IFABP-HA Linie 1 aufgrund der höchsten Anzahl integrierter Transgenkopien die stärkste Expression von HA mRNA im Dünndarmepithel, jedoch war in anderen Organen eine unerwünschte schwache Expression von HA mRNA nachweisbar. Hingegen war die Expression von HA mRNA im Dünndarmepithel der IFABP-HA Linien 2 und 3 sehr spezifisch. Linie 3 zeigte eine Expression von HA mRNA im gesamten Dünndarmepithel mit einem Expressionsmaximum im Jejunum. Die Generierung von IFABP-HA transgenen Mäusen mit einer spezifischen Expression des HA im Dünndarmepithel war somit erfolgreich. Weitere Analysen zur Bestätigung der Expression des HA-Proteins stehen noch aus.

4.1.2 FABPi-HA transgene Mauslinien

In FABPi-HA transgenen Mauslinien war gegenüber IFABP-HA und Villin-HA transgenen Mauslinien eine erhöhte Anzahl integrierter Transgenkopien (fünf bis 25) nachweisbar (Abb. 3-2). FABPi-HA transgene Mäuse der Linie 1 zeigten mit mehr als 25 integrierten Kopien die höchste Anzahl von Transgenen im Genom, was sich in der starken Expression von HA mRNA in dieser Linie im Vergleich zu den beiden anderen FABPi-HA transgenen Mauslinien widerspiegelte (s. Abb. 3-5B). Die hohe Anzahl integrierter Kopien war sehr wahrscheinlich auf übereinstimmende überlappende 5'- und 3'-Enden zurückzuführen, die bei der Linearisierung des Transgens durch das Restriktionsenzym SalI entstanden und eine Aggregation einzelner Transgene begünstigten. Die erwünschte exklusive und hohe Expression von HA mRNA im Epithel des Ileums und Kolon konnte in FABPi-HA transgenen Mauslinien nicht erreicht werden. FABPi-HA Mäuse der Linie 1 wiesen neben einer im Ileum nur schwachen Expression auch in zahlreichen anderen Organen hohe Expressionen von HA mRNA auf. In Linie 2 waren hingegen trotz einer Integration von ca. fünf Transgenkopien nur schwache und größtenteils unspezifische Expressionen von HA

mRNA nachweisbar. Für die Linie 3, in der ca. 12 Transgenkopien ins Genom integriert worden waren, war die Expression schon etwas spezifischer, allerdings wiesen hier der Thymus und das Duodenum eine starke, und die Organe Herz, Lunge und Leber eine schwache Expression von HA mRNA auf. Am ehesten erfüllte folglich die FABPi-HA transgene Mauslinie 3 das Kriterium einer hohen spezifischen Expression von HA mRNA. Weitere Analysen zur Bestätigung der Expression des HA-Proteins stehen wie für die IFABP-HA transgenen Mauslinien noch aus.

4.1.3 Villin-HA transgene Mauslinien

In den generierten Villin-HA transgenen Mauslinien waren nur wenige Transgenkopien im Genom nachweisbar (Abb. 3-3C). In Tieren der Linie 1 und 2 waren nur einzelne Kopien des Transgens nachweisbar, in der Villin-HA Linie 3 hingegen ca. 4 Kopien. Dieses Ergebnis steht sicherlich im Zusammenhang mit der Größe dieses Transgens, welches mit ca. 10.500bp wesentlich größer als die beiden anderen Transgene war und eine Integration der DNA-Sequenz ins Genom erschwerte. Dennoch wurde das Ziel einer spezifischen HA Expression in diesen Mauslinien vollständig erreicht. Alle drei generierten Mauslinien zeigten eine starke Expression von HA mRNA im gesamten Darmepithel, hingegen waren nur in der Linie 1 schwache Expressionsaktivitäten des Villin-Promotors in anderen Organen nachweisbar. Zusätzlich wies der Villin-Promotor in der Linie 3 eine schwache Expressionsaktivität in der Niere auf, was allerdings in der Literatur auch so beschrieben wird (Pinto *et al.*, 1999).

Villin-HA transgene Mauslinien standen als erste ab der 5. Rückkreuzungsgeneration zur Verfügung, da Villin-HA transgene Foundertiere zuerst generiert worden waren. Daher beschränkte sich der weitere Verlauf dieser Arbeit auf den Aufbau der beschriebenen Transfer- und Kreuzungsmodelle mit Villin-HA transgenen Mäusen (s. Kap 3.2, 3.3 und 3.4). Zunächst wurden die Villin-HA transgenen Mauslinien aber weiteren Expressionsanalysen unterzogen, um die spezifische Expression des HA im Darmepithel zu quantifizieren. Mit Realtime PCR wurde die relative Expression von HA mRNA im Thymus, Jejunum und im Ileum der drei Villin-HA transgenen Mauslinien quantitativ miteinander verglichen (Abb. 3-6A). Die Ergebnisse zeigten, dass die Expressionsniveaus von HA mRNA im Vergleich der Linien 1 und 2 für das Jejunum und das Ileum ungefähr gleich hoch waren. Dagegen war die Expression von HA mRNA in der Villin-HA Linie 3 um einen Faktor von vier bis fünf erhöht. In den

zuvor durchgeführten semiquantitativen Analysen wurde also die Expression der Linie 3 unterschätzt, da das maximale Plateau der PCR in den entsprechenden Proben längst vor Ablauf der 30 Amplifikationszyklen erreicht worden war. In semiquantitativen Analysen mit nur 25 Amplifikationszyklen fiel dieser Unterschied zwischen den Linien entsprechend stärker aus.

In Western Blots wurde die Expression des HA-Proteins im Darmepithel nachgewiesen (Abb. 3-6B). Der eingesetzte α -HA-Antikörper CMI1.2 erkannte in den Blots eine HA-spezifische Proteinbande bei ca. 55kD, was mit der erwarteten Fragmentgröße übereinstimmte. Gemessen an der Intensität der detektierten Banden der drei transgenen Villin-HA Mauslinien war die Expression von HA-Protein im Darmepithel der Linie 3 am stärksten. Im Vergleich dazu war die Proteinexpression der Linie 2 schwächer, aber noch deutlich stärker als in der Linie 1, wo nur eine schwache Bande für das HA-Protein nachgewiesen werden konnte. Zwischen der mRNA Expression und der Proteinexpression der Linie 1 ergab sich folglich eine Diskrepanz, die möglicherweise auf einen transgenen Effekt bei der Integration ins Genom zurückgeführt werden kann.

In histochemischen Schnitten konnte keine HA Expression in Villin-HA transgenen Mäusen nachgewiesen werden, was auf den hohen Anteil degradierender Enzyme und Proteasen im Darmlumen zurückzuführen ist (Vezys *et al.*, 2000). Auch in den Western Blots gelang der Nachweis des HA-Proteins nur durch die Verwendung von frisch isoliertem Probenmaterial und durch eine massive Inhibition der Proteaseaktivität mittels Zugabe von Proteaseblockern.

4.2 Das Transfer-Modell von 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in Villin-HA Mäuse

Das Transfermodell von 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen in Villin-HA Mäuse wurde primär zum Nachweis der Funktionalität der Expression und Präsentation des Transgens in den generierten Villin-HA Mauslinien aufgebaut. In diesem Modell sollte getestet werden, ob die Transgenexpression in den Enterozyten einen Effekt auf HA-spezifische T-Zellen ausübt. Für die Transferexperimente wurden ca. $2,5 \cdot 10^6$ HA-spezifische 6.5^+ $CD4^+$ T-Zellen zusammen mit ca. $7,5 \cdot 10^6$ 6.5^- $CD4^+$ T-Zellen in Villin-HA transgene und nicht-transgene Geschwistermäuse der Linie 2 intravenös transferiert. In einem ähnlichen Transfermodell führte der Transfer von naiven $CD4^+$ $CD45RB^{hi}$ -Zellen in SCID-

Mäusen nach ca. 3 bis 5 Wochen zu einer Kolitis, ein Kotransfer mit CD4⁺ CD45RB^{lo}-Memory-T-Zellen verhinderte hingegen den Ausbruch der Erkrankung (Morissey *et al.*, 1993; Powrie *et al.*, 1993; s. auch Kap. 1.4.1.2). Da sowohl CD45RB^{hi} als auch CD45RB^{lo} T-Zellen transferiert wurden, vermuteten wir, dass in unserem Modell unter den gegebenen Bedingungen keine überragende Entzündung ausgelöst werden würde, jedoch belegen andere Studien, dass auch bei Toleranzinduktion in antigenspezifischen T-Zellen diese zunächst antigenspezifisch aktiviert werden (Vezys *et al.*, 2000; Kreuwel *et al.*, 2002).

Nach sieben Tagen war der Großteil der HA-spezifischen 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in Villin-HA Mäusen überwiegend in den MLN nachweisbar (Abb. 3-7). Da der prozentuale Anteil 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen gegenüber nicht-transgenen Geschwistertieren in den MLN, aber nicht in den Milzen erhöht war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen sich aufgrund der Präsentation des spezifischen HA-Peptids in den MLN und der Aktivierung HA-spezifischer T-Zellen in Villin-HA Mäusen teilten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Aktivierungszustand der transferierten 6.5⁺ CD4⁺ und 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen bestimmt (Abb. 3-8). Es stellte sich heraus, dass 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen spezifisch aktiviert worden waren, da die T-Zellen die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 hoch- und das L-Selektin CD62L herunterregulierten. Auch nach 28 Tagen war immer noch der gleiche Grad an Aktivierung von 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen nachweisbar, allerdings hatte sich die prozentuale Anzahl 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen in den MLN verringert. Hingegen zeigten 6.5⁻ CD4⁺ T-Zellen keine nachweisbare Aktivierung. In weiteren Transferexperimenten wurden CFSE-markierte T-Zellen transferiert (Abb. 3-10). Diese Experimente belegen eindeutig, dass 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen sich *in-vivo* in Folge einer Aktivierung durch das von ihrem transgenen TCR erkannte spezifische Peptid teilten. Die Proliferation der T-Zellen fand überwiegend in den MLN und der Lamina propria von Villin-HA transgenen Mäusen statt und war wesentlich stärker ausgeprägt als die von CL4-TCR transgenen T-Zellen in einem Transfermodell zur Diabetes (Kreuwel *et al.*, 2000).

Zusammengenommen demonstrierten die Aktivierung und die Proliferation HA-spezifischer 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen überzeugend die Funktionalität der generierten Villin-HA transgenen Mäuse. Die Infiltration des Darms von Villin-HA und nicht-transgenen Mäusen wurde in histologischen Schnitten analysiert (Abb. 3-9). Erst nach 28 Tagen war in Villin-HA Mäusen eine Infiltration von Lymphozyten im HA-exprimierenden intestinalen Epithel, aber nicht in der Lamina propria nachweisbar. Dieses Ergebnis ist

einerseits ungewöhnlich, da im intestinalen Epithel überwiegend CD8⁺ Lymphozyten zu finden sind (Jarry *et al.*, 1990). Es wäre daher zu vermuten gewesen, dass CD4⁺ T-Zellen bevorzugt in die Lamina propria infiltrieren würden. Andererseits löste möglicherweise die Präsentation von HA auf MHC Klasse-II-Molekülen von Enterozyten diese Infiltration aus und führte möglicherweise zur Induktion von Toleranz in den Lymphozyten (Zimmer *et al.*, 2000). Letztlich führte die Aktivierung und die Infiltration der 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen ins intestinale Epithel nicht zu einer massiven Entzündung des Epithels, da in den histologischen Schnitten keine Gewebeschädigungen oder Läsionen beobachtet werden konnten. In vergleichbaren Studien löste eine Aktivierung spezifischer transferierter T-Zellen ebenfalls keine Entzündung aus, der Transfer von CD8⁺ OT-1 T-Zellen führte erst bei einer gleichzeitigen Infektion mit einem Ova-exprimierenden Virus zur massiven Zerstörung des Epithels (Vesyz *et al.*, 2000).

4.3 Die autoimmunen Villin-HA x CL4-TCR und Villin-HA x TCR-HA Modelle

Mit dem Aufbau der doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA und Villin-HA x CL4-TCR Kreuzungsmodelle sollte die Fragestellung untersucht werden, ob transgene CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Zellen unter autoimmunen Bedingungen über das Potential zur Initiation immunpathogener Mechanismen verfügen, eine enterozytenspezifische intestinale Entzündung auszulösen. Studien in Mausmodellen weisen auf eine Beteiligung autoimmuner Mechanismen bei der Auslösung und Chronizität der Erkrankung hin (Raedler und Schreiber, 1992), außerdem wurden Autoantikörper gegen Selbstantigene in Patienten nachgewiesen (Mizoguchi *et al.*, 1996; Seibold *et al.*, 1998). Der Aufbau eines chronischen doppelt-transgenen Kolutismodells ermöglicht es, die in den transgenen T-Zellen induzierten Effektormechanismen zu analysieren und hieraus Rückschlüsse zu ziehen, ob autoimmune Mechanismen zur Auslösung von CEDE beitragen. Für den Aufbau der doppelt-transgenen Modelle wurden Villin-HA Mäuse ab der 5. Rückkreuzungsreaktion mit TCR-HA oder CL4-TCR transgenen Mäusen verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden nach Bestimmung ihres Genotyps für Experimente genutzt.

Zunächst soll in diesem Kapitel erörtert werden, ob die zentrale Toleranz im Thymus zur klonalen Deletion autoreaktiver $6.5^+ CD4^+$ und $V\beta 8^+ CD8^+$ T-Zellen führte (Kap. 4.3.1). Im Anschluss daran werden die Ergebnisse aus den doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA (Kap. 4.3.2) und Villin-HA x CL4-TCR Modellen (Kap. 4.3.3) diskutiert.

4.3.1 Zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz im Thymus verhindert die Entwicklung autoreaktiver T-Zellen. Während der negativen Selektion werden T-Zellen gegenüber Selbstantigenen auf Bindungsaffinitäten überprüft, reagierende T-Zellen sterben über eine Rezeptor-vermittelte Apoptose ab (Kisielow *et al.*, 1988; Boehmer von *et al.*, 2003). Eine wesentliche Voraussetzung für den Aufbau der autoimmunen Villin-HA x TCR-HA und Villin-HA x CL4-TCR Modelle war aber die Generierung von Villin-HA transgenen Mauslinien, bei denen autoreaktive T-Zellen der klonalen Deletion entkommen. Nur bei einer Entwicklung von $6.5^+ CD4^+$ bzw. $V\beta 8.2^+ CD8^+$ HA-spezifischen T-Zellen konnten die immunpathogenen Mechanismen induziert und untersucht werden, die durch die gleichzeitige Anwesenheit der autoreaktiven T-Zellen und der enterozytenspezifischen Expression des HA-Proteins ausgelöst werden. Folglich war es unabdingbar, das Ausmaß der klonalen Deletion von $6.5^+ CD4^+$ bzw. $V\beta 8.2^+ CD8^+$ transgenen T Zellen in doppelt-transgenen Mäusen zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass in doppelt-transgenen Villin-HA Linie 2 x TCR-HA Mäusen ca. 30%, in Villin-HA Linie 2 x CL4-TCR Mäusen weniger als 10% der HA-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu TCR Kontrollmäusen deletiert wurden (Abb. 3-11 und Abb. 3-18). Hingegen wurde bei Verpaarungen der Villin-HA Linie 1 mit TCR transgenen Mäusen in doppelt-transgenen Tieren der überwiegende Großteil der autoreaktiven T-Zellen deletiert. Folglich war in doppelt-transgenen Villin-HA Linie 2 x TCR-HA Mäusen die zentrale Deletion von $6.5^+ CD4^+$ bzw. $V\beta 8.2^+ CD8^+$ transgenen T Zellen unzureichend, da potentiell autoaggressive HA-spezifische T-Zellen sich im Thymus entwickelten und in der Peripherie nachweisbar waren (Abb. 3-12 und Abb. 3-19).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine linienspezifische Expression des HA-Proteins im Thymus von Villin-HA transgenen Mäusen für die unterschiedlichen Prozentzahlen sich entwickelnder transgener T-Zellen verantwortlich war. Es ist eine bekannte Tatsache, dass die Antigenexpression im Thymus die

Voraussetzung für eine klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen ist (Nossal, 1994; Boehmer *et al.*, 2003). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden quantitative Realtime PCR Analysen im Thymus von Villin-HA Mäusen HA mRNA durchgeführt (Abb. 3-6A). Mit dieser hochempfindlichen Methode wurden im Vergleich zu den Expressionsniveaus im Jejunum und Ileum nur sehr geringe Mengen an HA mRNA im Thymus von Villin-HA transgenen Tieren nachgewiesen. Allerdings war das relative Expressionsniveau der Linie 1 im Vergleich zu den Linien 2 und 3 um einen Faktor von 10 bzw. 30 erhöht. In der Linie 1 wurde ein Großteil der transgenen T-Zellen deletiert, in den Linien 2 und 3 dagegen nur ein geringer Anteil der $6.5^+ CD4^+$ bzw. $V\beta 8^+ CD8^+$ transgenen T Zellen. Folglich bestätigte sich das Ergebnis, dass eine klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen nur bei Expression des Autoantigens im Thymus erfolgen kann. Villin-HA Mäuse der Linie 3 wiesen den geringsten Anteil an klonal deletierten transgenen T-Zellen auf (Daten nicht gezeigt). Da aber bereits die Transferexperimente mit Villin-HA Linie 2 transgenen Mäusen durchgeführt worden waren und in doppelt-transgenen Villin-HA Linie 2 x TCR-HA bzw. CL4-TCR Mäusen nur geringfügig verringerte Prozentzahlen an transgenen T-Zellen im Vergleich zu Line 3 Mäusen nachweisbar waren, wurden auch für die weiteren Experimente in den doppelt-transgenen Kreuzungsmodellen ausschließlich Villin-HA Linie 2 Mäuse verwendet.

4.3.2 Villin-HA x TCR-HA Modell

$CD4^+ CD25^+$ bzw. $CD4^+ CD45RB^{low}$ regulatorische T_R -Zellen sind für die Regulation und Kontrolle von inflammatorischen Prozessen verantwortlich (Roncarolo und Levings, 2000; Sakaguchi, 2003). Regulatorische T-Zellen induzieren eine Immunsuppression in die T-Zellen ihrer Umgebung und inhibieren durch Sekretion der regulatorischen Zytokine IL-10 oder TGF- β unangemessene Immunantworten gegenüber harmlosen Antigenen (Ludviksson *et al.*, 2000; Strober *et al.*, 1998b). Kürzlich wurde gezeigt, dass $CD4^+ CD45RB^{high}$ -T Zellen in der Lage sind, eine intestinale Entzündung in T-Zell-defizienten Mäusen auszulösen (Dohi *et al.*, 2003). Im Villin-HA x TCR-HA Modell sollte deshalb untersucht werden, ob potentiell autoreaktive $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen eine Entzündung in doppelt-transgenen Mäusen auslösen können und somit $CD4^+$ MHC Klasse-II-restringierte T-Zellen an den immunpathogenen Mechanismen beteiligt sein könnten, die beim Menschen zu CEDE führen.

Zunächst wurden doppelt-transgene Mäuse auf optisch erkennbare Anzeichen einer intestinalen Inflammation, wie beispielsweise einer Diarrhö, untersucht. Außer einer leichten Vergrößerung der MLN in makroskopischen Analysen war jedoch kein Phänotyp bzw. eine Erkrankung der Tiere zu erkennen. Wie bereits im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, entwickelten sich HA-spezifische T-Zellen im Thymus und wanderten in die Peripherie ein. Während in den Milzen von doppelt-transgenen Mäusen der prozentuale Anteil an $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen gegenüber TCR-HA transgenen Mäusen um mehr als 70% verringert war, betrug die Reduktion für die MLN ca. 40% (Abb. 3-12). Diese Reduktion der T-Zellen in den doppelt-transgenen Mäusen lässt sich durch zwei unterschiedliche Ansätze erklären. Zum einen ist es möglich, dass naive T-Zellen in der Peripherie durch eine ausschließliche Aktivierung über ihren TCR anergisch und durch Rezeptor-vermittelte Apoptose deletiert wurden (Chen *et al.*, 1995; Marth *et al.*, 1996). Eine zweite Hypothese stellt die vermehrte Infiltration von $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in die MLN und ins Darm-assoziierte Gewebe aufgrund ihrer Aktivierung dar. Mit großer Wahrscheinlichkeit trifft die zweite Hypothese zu, da durchflusszytometrische Analysen der Aktivierungsmarker auf $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen demonstrierten, dass die T-Zellen aktiviert worden waren (Abb. 3-13), isolierte $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen *in-vitro* in Gegenwart ihres spezifischen Antigens proliferierten (Abb. 3-14) und die T-Zellen in die Darm-assoziierten Gewebe infiltrierten (Abb. 3-15).

Milzen und MLN von doppelt-transgenen Mäusen wiesen signifikant erhöhte Werte an $6.5^+ CD4^+ CD69^-$ und $CD25^-$ -exprimierenden T-Zellen auf, im gleichen Maße verringerten sich in doppelt-transgenen Mäusen die Frequenzen an $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen, die $CD62L$ und $CD45RB$ exprimierten (Abb. 3-13). Dieses Profil ließ auf eine Aktivierung von T-Zellen schließen (Kreuwel *et al.*, 2002). Wahrscheinlich waren nahezu alle $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen aktiviert worden, da $CD69^-$ und $CD25^-$ -positive T-Zellen in durchflusszytometrischen Analysen weitgehend voneinander getrennte Subpopulationen darstellten. Interessanterweise waren in der Lamina propria und im intestinalen Epithel kaum Unterschiede im Vergleich der Expressionsprofile von TCR-HA transgenen und doppelt-transgenen Mäusen nachweisbar. Dies lässt sich allerdings auch darauf zurückzuführen, dass der überwiegende Anteil der $CD4^+$ T-Zellen sich in den Darm-assoziierten Geweben in einem aktivierten Zustand befindet (Agace *et al.*, 2000). Nur in der Lamina propria war eine signifikant induzierte Population von $CD25^+$ -positiven $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen

nachweisbar. Ob dieser T-Zellsubpopulation besondere regulatorische Eigenschaften zukommen, muss zukünftig untersucht werden.

Um auszuschließen, dass $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen infolge eines Antigenkontaktes anergisiert worden waren, wurden die T-Zellen *in-vitro* mit ihrem spezifischen Antigen stimuliert (Abb. 3-14). In einem ähnlichen doppelt-transgenen Mausmodell führte die Expression von HA unter einem B-Zell-spezifischen Ig-Promotor neben einer zentralen Toleranz im Thymus auch zu einer Toleranz in der Peripherie (Buer *et al.*, 1998). In Antigenstimulationsexperimenten, in denen identische Zellzahlen $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen von doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA und TCR-HA Mäusen eingesetzt wurden, zeigten sich aber keine messbaren Unterschiede im Proliferationsverhalten der Zellen. $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen waren demnach funktionell und besaßen das Potential *in-vivo* auf ihr Antigen zu reagieren.

In histologischen Schnitten sollte die Frage beantwortet werden, ob Villin-HA x TCR-HA Mäuse im Laufe ihres Lebens eine intestinale Entzündung entwickelten (Abb. 3-15). Doppelt-transgene Mäuse zeigten eine milde Enterocolitis, die sich zum einen anhand von moderaten Lymphödemem im Dünndarm und zum anderen durch eine Infiltration von CD3-positiven Lymphozyten manifestierte. Die Werte an infiltrierenden T-Zellen waren in der Lamina propria und im intestinalen Epithel von Villin-HA x TCR-HA drei- bzw. zweifach im Vergleich zu TCR-HA Mäusen erhöht.

Die im autoimmunen Villin-HA x TCR-HA Modell gewonnenen Erkenntnisse demonstrieren deutlich, dass enterozytenspezifische MHC Klasse-II-restringierte $CD4^+$ T-Zellen eine chronische mukosale Entzündung auslösen können. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse aber auch, dass das immunologische Gleichgewicht in doppelt-transgenen Mäusen durch die enterozytenspezifische Expression des HA-Proteins und durch die Aktivierung der $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen gestört worden war. Offensichtlich entwickelten doppelt-transgene Mäuse jedoch keine schwerwiegende akute Enterocolitis. Um zu untersuchen, ob regulatorische T-Zellen eine Toleranz in $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen induzierten, wurden mit der quantitativen Realtime PCR charakteristische Markergene für T_H1 , T_H2 und T_H3 -Immunantworten in CD25-positiven und CD25-negativen $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen gemessen (Abb. 3-16). Für die Expression der analysierten T_H1 und T_H2 -Markergene waren nur kleinere Abweichungen in den einzelnen T-Zellsubpopulationen messbar, dagegen ergaben sich für die immunregulatorischen Markergene deutliche Unterschiede. Vor kurzem wurde der Transkriptionsfaktor FoxP3 (**F**orkhead/**w**inged helix **P**rotein 3) entdeckt, der eine

Schlüsselfunktion bei der Differenzierung regulatorischer T-Zellen einnimmt (Hori *et al.*, 2003). In CD25-negativen T-Zellen von doppelt-transgenen Mäusen wurde die mRNA Expression dieses Transkriptionsfaktors gegenüber TCR-HA Mäusen deutlich gesteigert. Ebenso wurde in CD25-negativen T-Zellen verstärkt mRNA für den Oberflächenrezeptor PD-1 gebildet. PD-1 (**P**rogrammed **D**eath-1) wirkt, ähnlich wie CTLA-4, einer Aktivierung von T-Zellen entgegen (Nishimura *et al.*, 1999; Okazaki, 2002). Ebenso war die Expression des immunregulatorischen Zytokins IL-10 (Asseman und Powrie, 1998; Fuss *et al.*, 2002) in CD25-negativen T-Zellen aus Villin-HA x TCR-HA Mäusen erhöht. Die gesteigerte Expression der regulatorischen Markergene deutet darauf hin, dass in den MLN regulatorische T-Zellen gebildet werden. Möglicherweise wandern diese regulatorischen T-Zellen von dort aus in die intestinale Mukosa ein, um dort die Effektorfunktionen von autoreaktiven T-Zellen zu begrenzen.

4.3.3 Villin-HA x CL4-TCR Modell

Mukosale Entzündungen und Gewebeschädigungen werden hauptsächlich durch zelluläre Immunantworten vermittelt. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen töten Antigen-präsentierende Zielzellen über eine spezifische Zelllyse und der Sekretion von Perforinen ab (Kagi *et al.*, 1995; Kagi *et al.*, 1996). Außerdem sekretieren CD8⁺ T-Zellen inflammatorische Zytokine wie beispielweise TNF- α , welches den proinflammatorischen Prozess durch eine gesteigerte Infiltration unspezifischer mononuklearer Zellen verstärkt (Krakauer *et al.* 1995; Ware *et al.*, 1996).

Im kürzlich veröffentlichten GFAP-HA x CL4-TCR Modell verstarben doppelt-transgene Mäuse innerhalb von wenigen Tagen nach der Geburt an einer durch HA-spezifische transgene CD8⁺ T-Zellen induzierte Zerstörung von HA-exprimierenden Gliazellen, was eine schwer entzündliche akute Jejuno-Ileo-Colitis nach sich zog (Cornet *et al.*, 2001). Es wurde daher angenommen, dass der Aufbau eines doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Modells ebenfalls zu einer Entzündung in doppelt-transgenen Mäusen führen würde. Die Ergebnisse des Villin-HA x CL4-TCR Modells sollten mit denen des Villin-HA x TCR-HA Modells verglichen werden, um die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede von autoreaktiven CD8⁺ und CD4⁺ HA-spezifischen T-Zellen zu analysieren.

Erstaunlicherweise wurden in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen trotz der Entwicklung autoreaktiver T-Zellen mit Ausnahme von leicht geschwollenen MLN

zunächst keine klinischen Anzeichen einer schwerwiegenden Erkrankung beobachtet. Im Thymus von doppelt-transgenen Villin-HA Linie 2 x CL4-TCR Mäusen kam es in Analogie zum Villin-HA x TCR-HA Modell zur Entwicklung autoreaktiver T-Zellen und nur zu einer geringfügigen Deletion von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen. Im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen wurden in doppelt-transgenen Mäusen weniger als 10% der sich entwickelnden Thymozyten mit einem transgenen TCR deletiert (Abb. 3-18). Transgene HA-spezifische T-Zellen migrierten nach Abschluss ihrer Entwicklung im Thymus in die Peripherie (Abb. 3-19). Im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen waren die prozentualen Zellzahlen an $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in den Milzen und den MLN doppelt-transgener Mäuse ähnlich denen in doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen verringert. Diese Reduktion betrug für Milz und MLN ca. 40%.

Außer einer geringfügig verstärkten Expression des frühen Aktivierungsantigens CD69 konnte eine Aktivierung von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-20). Andererseits zeigten Färbungen auf der Oberfläche von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen mit MHC Klasse-I-Tetrameren (Altman *et al.*, 1996), dass der transgene TCR in doppelt-transgenen Mäusen in Folge einer Aktivierung herunterreguliert worden war (Abb. 3-21). Dieses Phänomen bei der Aktivierung von T-Zellen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Romero *et al.*, 1998; Nielen *et al.*, 2000). Demnach waren die T-Zellen in Folge eines Antigenkontaktes aktiviert worden, zeigten aber nicht die typischen Aktivierungsmarker von funktionell aktivierten T-Zellen. Es wurde daher angenommen, dass $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aufgrund ihres Antigenkontaktes in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen anergisiert worden waren. Tatsächlich zeigte sich in Antigenstimulationsexperimenten (Abb. 3-22 und Abb. 3-23) eine stark verringerte oder gänzlich abwesende Proliferation von $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus doppelt-transgenen Mäusen in Gegenwart ihres spezifischen Antigens. Bei Stimulation durch das Mitogen Concavalin A zeigten dagegen $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen aus doppelt-transgenen und CL4-TCR Kontrollmäusen ein ähnliches Verhalten in ihrer Proliferation.

Zum Abschluss wurde in histologischen Schnitten untersucht, ob $V\beta 8^+$ $CD8^+$ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen die Darm-assoziierten Gewebe infiltrierten und somit eine Enterocolitis auslösten (Abb. 3-24). Doppelt transgene Mäuse zeigten in den LPL- und IEL-Kompartimenten im Vergleich zu CL4-TCR Mäusen eine Infiltration mit CD3-positiven Lymphozyten. Die Werte an infiltrierenden T-Zellen waren in der Lamina propria und im intestinalen Epithel von Villin-HA x CL4-TCR- vier- bzw. dreifach im

Vergleich zu CL4-TCR Mäusen erhöht. Die in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen induzierte Form der Enterocolitis war demnach schwerwiegender als die in doppelt-transgenen Villin-HA x TCR-HA Mäusen, führte aber nicht zu einer Zerstörung von Epithelzellen oder löste eine akute Enterocolitis aus.

Im Gegensatz zu der beobachteten chronischen Enterocolitis und der Anergie der T-Zellen in den beschriebenen doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen verstarben aber zwei von acht observierten doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen nach 91 bzw. 102 Tagen, Kontrolltiere verschieden dagegen nicht. Dieser letale Verlauf der Erkrankung war mit einer chronischen Pancolitis verbunden, die von einem rektalen Prolaps (Darmvorfall), schweren Ulzerationen und einer massiven Infiltration von Neutrophilen in die Lamina propria begleitet wurde und zu eine Sepsis in den Tieren führte (Abb. 3-17). Durch die klinische Analyse von Stuhlbiopsien auf die Anwesenheit von mikrobiellen pathogenen Erregern wurde eine unerkannte systemische Infektion als Auslöser für den Tod der Mäuse ausgeschlossen. Folglich verschieden die doppelt-transgenen Mäuse aufgrund von primär oder sekundär induzierten autoimmunen Mechanismen, die zu einem letalen Verlauf der Erkrankung führten.

4.4 Perspektiven für Villin-HA transgene Mäuse als Modellsystem für CEDE

Es wurde gezeigt, dass in doppelt-transgenen Mäusen eine chronische intestinale Entzündung durch die Gegenwart HA-spezifischer T-Zellen und durch die gleichzeitige enterozytenspezifische Expression von HA ausgelöst wird. Die enterozytenspezifische Expression von HA führte demnach in den autoimmunen Villin-HA x TCR Modellen zu einer Störung der immunologischen Balance, die ein Gleichgewicht gegenüber der Abwehr von pathogenen Bakterien und der Toleranz gegenüber harmlosen luminalen Antigenen der Darmflora aufrecht erhalten muss (Nagler-Anderson, 2001). Neben den bereits in der Einleitung diskutierten Vorteilen der Antigenspezifität, der Nutzbarkeit von etablierten Testsysteme und der Möglichkeit autoimmune Mechanismen in Villin-HA Mäusen zu untersuchen (s. Kap. 1.5), besteht ein weiterer wesentlicher Vorteil dieses Modells gegenüber anderen darin, dass eine chronische Entzündungsreaktion unter physiologischen Bedingungen induziert wurde. Der Verlauf von CEDE im Menschen ist gleichsam durch eine Chronizität und der Abwesenheit nachweisbarer

ätiologischer Agentien gekennzeichnet (Strober *et al.*, 1998a). Es besteht daher berechtigter Anlass zu der Hoffnung, dass sich die Villin-HA Maus in Zukunft als geeignetes Modell für die Erforschung von CEDE erweisen wird.

Die Fragestellungen, die sich in der Villin-HA Maus untersuchen lassen, sind vielfältig. Die Ergebnisse in den doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR und Villin-HA x TCR-HA Mäusen weisen darauf hin, dass die Anergie von T-Zellen und die Induktion regulatorischer T-Zellen bedeutende Rollen bei der Suppression einer intestinalen Inflammation spielen. Diese Mechanismen zur Toleranzinduktion müssen genauer charakterisiert und analysiert werden. Eine Möglichkeit dazu bietet die molekulare DNA Mikro-Array Technologie, die zur Aufklärung der relevanten Gene, die an diesen Prozessen beteiligt sind, beitragen wird (Schena *et al.*, 1996; Lockhart und Winzeler, 2000). *In-vivo* lassen sich die Funktionen dieser Gene durch Antikörper- oder Zytokingaben beeinflussen und überprüfen. Dieses Verfahren ist bereits in vielen anderen Modellen mit Erfolg angewandt worden (Neurath *et al.*, 1995; Read *et al.*, 2000). Durch die Administration von α -PD-1 Antikörpern ließe sich beispielsweise die regulatorische Funktion des inhibitorischen PD-1 Rezeptors beeinflussen und untersuchen. Des weiteren kann im Villin-HA Transfermodell die Funktion von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel FoxP3 mit Hilfe des neu entwickelten RNA Interferenz Verfahren analysiert werden (Elbashir *et al.*, 2001). Dazu müssten die HA-spezifischen T-Zellen zur Abschaltung des Transkriptionsfaktors mit doppelsträngigen RNA-Duplices transfiziert und anschließend in Villin-HA Mäuse transferiert werden.

Ebenso wichtig ist eine Untersuchung der Faktoren, die zu einem Bruch der Toleranz in Villin-HA Mäusen führen. Eine Möglichkeit stellt hier der Transfer von $6.5^+ CD4^+ CD45RB^{hi}$ oder $6.5^+ CD4^+ CD25^+$ T-Zellen in Villin-HA Mäuse dar, diese T-Zellpopulation sollte zur Initiation einer schweren Enterocolitis führen (Morissey *et al.*, 1993; Read *et al.*, 2000). In anderen Kolitis-Modellen stellen Bakterien den auslösenden Faktor für eine intestinale Entzündung dar (Elson, 1999, Rath *et al.*, 2001). Daher wurden in unserer Arbeitsgruppe rekombinante HA-exprimierende *E. coli* Nissle-Bakterien hergestellt, mit denen der Darmtrakt von doppelt-transgenen Villin-HA x TCR Mäusen besiedelt werden soll. Hiermit lassen sich die Auswirkungen der luminalen bakteriellen HA-Expression auf die regulatorischen bzw. inflammatorischen Prozesse im Darm studieren.

In einer anderen Studie konnte die Toleranz von OT-1 transgenen T-Zellen gegenüber IFABP-OVA exprimierenden Epithelzellen erst durch eine Koinfektion mit Ova-

exprimierenden Viren gebrochen werden (Vezys *et al.*, 2000). Da gezeigt wurde, dass Adenoviren das Darmepithel effizient transduzieren können (Wirtz *et al.*, 1999b), wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein adenoviraler Vektor hergestellt, der unter Verwendung eines CMV-Promotors und eines IRES-(Intra-Ribosomal-Entry-Site)-Elementes eine bicistronische Expression von HA und GFP (Green Fluorescence Protein) ermöglicht (Abb. 4-1). Die Funktionalität der replikationsdefizienten rekombinanten Viren wurde bereits anhand der Expression von HA und GFP in Caco-2 transfizierten Zellen bestätigt. Es bleibt abzuwarten, wie sich eine adenovirale Infektion auf die Toleranzmechanismen in doppelt-transgenen Mäusen auswirken wird.

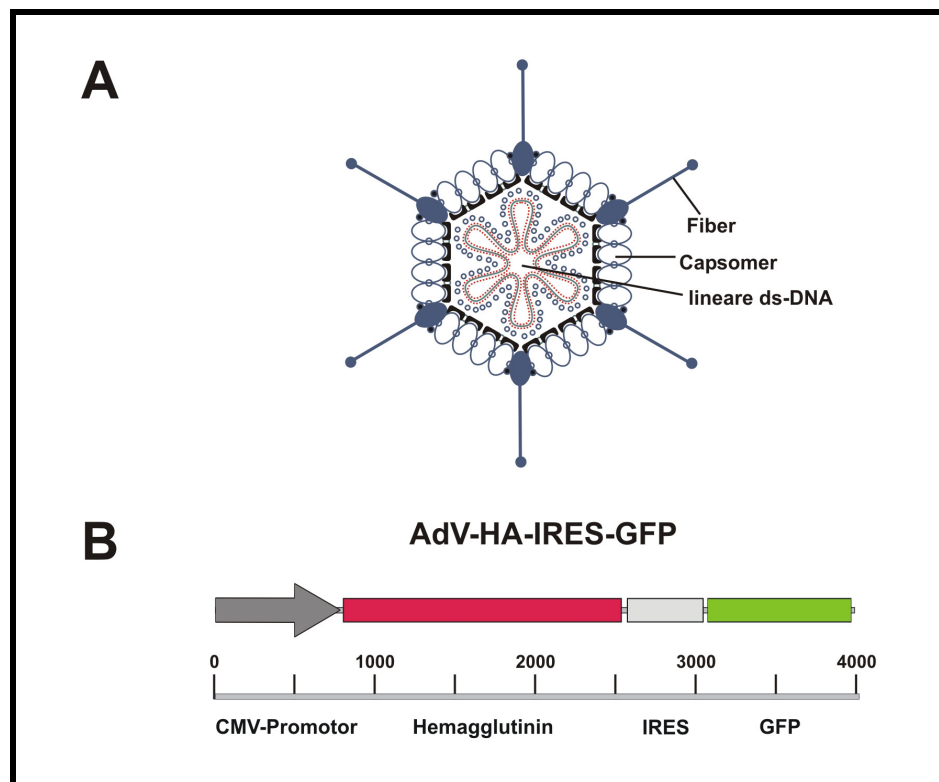


Abb. 4-1: Adenoviraler Vektor

A zeigt den schematischen Aufbau eines Adenovirus. Das lineare doppelsträngige DNA-Genom der Adenoviren mit 36.000bp befindet sich in einer ikosaedrischen Proteinhülle, die sich aus insgesamt 252 Capsomeren zusammensetzt. Ebenfalls in der Proteinhülle eingelagert sind die Fiber-Proteine, die dem Virus zur Adsorption an seine Wirtszelle dienen. B stellt die insertierte Expressionskassette dar, die in der E3-deletierten Region des Adenovirus insertiert wurde. Das ca. 3.900bp große Konstrukt besteht aus einem CMV-Promotor, den Proteinen GFP und HA, sowie dem IRES-Element, welches eine bicistronische Expression der Proteine ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CEDE), deren Ätiopathogenese vermutlich durch einen Toleranzverlust gegenüber der intestinalen Mikroflora verursacht wird, wobei genetische Prädispositionen den Ausbruch der Erkrankung begünstigen. CEDE weisen einige Charakteristika von Autoimmunerkrankungen auf, bisher jedoch konnten keine Selbstantigene in Patienten nachgewiesen werden, die eine Rolle in der Ätiologie und Chronizität der Erkrankung spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob autoimmune Mechanismen bzw. die Anwesenheit von potentiell autoreaktiven enterozytenspezifischen T-Zellen zu einer mukosalen Entzündung des Darms oder aber zu einer Toleranz führt.

Zum Aufbau des Mausmodells wurden zunächst HA-transgene Mauslinien generiert, die unter drei verschiedenen darmspezifischen Promotoren das virale Hemagglutinin-Protein exklusiv im Darm exprimieren. Durch Pronukleusinjektionen in *in-vitro* fertilisierte Oozyten wurden Mauslinien für die drei genetischen Konstrukte Villin-HA, IFABP-HA und FABPi-HA generiert und anschließend auf einen BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt. IFABP-HA und Villin-HA transgene Mauslinien zeigten eine exklusive Expression von HA mRNA im Dünndarm- bzw. im gesamten Darmepithel, hingegen war in FABPi-HA transgenen Mauslinien auch in anderen Organen HA mRNA nachweisbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Villin-HA Mäuse für den Aufbau des Transfermodells und der Kreuzungsmodelle mit TCR-transgenen Mäusen verwendet.

Die Expression des HA-Proteins wurde in Villin-HA transgenen Mäusen bestätigt. Zur Überprüfung der Funktionalität des Villin-HA x TCR-HA Modells wurde ein adoptiver Transfer von $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen aus TCR-HA Mäusen in Villin-HA Mäuse durchgeführt. Im Gegensatz zu nicht-transgenen Geschwistertieren wurden in Villin-HA transgenen Mäusen $6.5^+ CD4^+$ T-Zellen spezifisch aktiviert. Diese zeigten eine Proliferation in den MLN, von wo aus sie in die Darm-assoziierten Gewebe einwanderten. Vier Wochen nach dem Transfer war eine Infiltration des intestinalen Epithels in Villin-HA transgenen Mäusen zu beobachten. Diese Ergebnisse demonstrierten die Funktionalität der Villin-HA Maus.

Es wurde gezeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen in T-Zell-defizienten Mäusen eine Enterocolitis auslösen. Andererseits verhindern regulatorische $CD4^+ CD45RB^{low}$ bzw. $CD25^+$ T-Zellen eine Entzündung in SCID-Mäusen. Daher wurde im Villin-HA x TCR-HA

Modell untersucht, ob die Anwesenheit autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen in doppelt-transgenen Mäusen zu einer intestinalen Entzündung führt. Im Thymus doppelt-transgener Villin-HA x TCR-HA Mäuse entwickelten sich naive 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen, die in die Peripherie migrierten. Diese 6.5⁺ CD4⁺ T-Zellen zeigten eine spezifische Aktivierung und proliferierten *in-vitro* in Gegenwart ihres spezifisches HA-Peptids. Die Infiltration von CD3⁺ Lymphozyten in das intestinale Epithel und in die Lamina propria löste eine milde chronische Enterocolitis in doppelt-transgenen Mäusen aus. Erstmals wurde hiermit gezeigt, dass autoreaktive enterozytenspezifische CD4⁺ T-Zellen eine chronische intestinale Inflammation initiieren. Allerdings scheinen regulatorische Mechanismen einen aggressiveren Verlauf der Entzündung zu verhindern, die Daten der mRNA-Expression in den MLN doppelt-transgener Mäuse deuten auf die Induktion immunregulatorischer Gene und somit auf eine Toleranzinduktion hin.

Mukosale Entzündungsprozesse werden vornehmlich durch CD8⁺ T-Zellen vermittelt. Daher wurde das Villin-HA x CL4-TCR Modell aufgebaut, um den Einfluss von autoreaktiven Vβ8⁺ CD8⁺ T-Zellen auf eine intestinale Entzündung zu untersuchen und mit dem von CD4⁺ T-Zellen zu vergleichen. Vβ8⁺ CD8⁺ T-Zellen wurden in doppelt-transgenen Mäusen ebenfalls aktiviert und infiltrierte die darmassoziierten Kompartimente. Im Vergleich zum Villin-HA x TCR-HA Modell war die hierdurch induzierte chronische Enterocolitis schwerwiegender. Jedoch wiesen die transgenen Vβ8⁺ CD8⁺ T-Zellen weder eine Expression von Aktivierungsmarkern auf noch reagierten sie *in-vitro* auf ihr spezifisches HA-Peptid, was auf eine Anergie der T-Zellen in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen schließen lässt. Die Infiltration transgener Vβ8⁺ CD8⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger Anergie stellt einen Widerspruch dar, der durch die beobachteten letalen ulzerativen Enterocolitisfälle im Villin-HA x CL4-TCR Modell noch verstärkt wird. Zukünftige Analysen werden hier zeigen müssen, wie sich dieser Widerspruch erklären lässt.

Abschließend zeigen diese Ergebnisse, dass mit der Villin-HA Maus ein vielversprechendes Modellsystem generiert wurde, um die immunpathogenen und regulatorischen Mechanismen der intestinalen Mukosa aufzuklären. Die Villin-HA Maus verbindet den Vorteil der Antispezifität mit dem der Entwicklung einer chronischen Entzündung in doppelt-transgenen Mäusen unter physiologischen Bedingungen. Somit stellt die Villin-HA Maus ein interessantes Mausmodell dar und wird einen Beitrag zur Aufklärung der Ätiologie von CEDE leisten.

6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cellular and molecular immunology. Saunders Company, 1994.

Adler G (Editor): Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Springer Verlag: 1996.

Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM. Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol* 30: 819-826, 2000.

Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 854-866, 2002.

Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2: 725-731, 2001.

Allen WD, Smith CG, Porter P. Localization of intracellular immunoglobulin A in porcine intestinal mucosa using enzyme-labelled antibody. An ultrastructural study. *Immunology* 25: 55-70, 1973.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes" *Science* 274: 94-96, 1996.

Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3: 756-763, 2002.

Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4⁺, CD45RB high T cells to SCID recipients. *J Immunol* 158: 3464–3473, 1997.

Asseman C und Powrie F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. *Gut* 42: 157-158, 1998.

Ayabe T, Satchell DP, Pesendorfer P, Tanabe H, Wilson CL, Hagen SJ, Ouellette AJ. Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. *J Biol Chem* 277: 5219-5228, 2002.

Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 12: 881-922, 1994.

Banchereau J und Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252, 1998.

Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3: 99-108, 1995.

Bargen J. Experimental studies on the etiology of chronic ulcerative colitis. *J Am Med Assoc* 83: 332-336, 1924.

Beagley KW und Elson CO. Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Gastroenterol Clin North Am* 21: 347-366, 1992.

Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta⁺ T cells. *Nature* 372: 691-694, 1994.

Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol* 163: 947-953, 1999.

Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185-195, 1993.

Bienenstock J und Perey DY. Immune mechanisms of mucosal resistance. *Med Clin North Am* 56: 391-402, 1972.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523, 1979.

Bleicher PA, Balk SP, Hagen SJ, Blumberg RS, Flotte TJ, Terhorst C. Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250: 679-682, 1990.

Bland PW und Kambarage DM. Antigen handling by the epithelium and lamina propria macrophages. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 577-596, 1991.

Blumberg RS and Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 285: 643-647, 2001.

Boehmer von H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F, Klein L. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 191: 62-78, 2003.

Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazalone colitis: a murine model of Thelper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 188: 1929-1939, 1998.

Boismenu R und Havran WL. An innate view of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 9: 57-63, 1997.

Brand CM und Skehel JJ. Crystalline antigen from the influenza virus envelope. *Nat New Biol* 238: 145-147, 1972.

Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 363:461-464, 1993.

Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 836-840, 1988.

Bruce MG und Ferguson A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. *Immunology* 57: 627-630, 1986.

Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan A. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 187: 177-183, 1998.

Campbell NA: Biologie. Spektrum-Verlag, 1997.

Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31: 417-427, 1982.

Caton AJ, Stark SE, Shih FF, Cerasoli DM. Transgenic mice that express different forms of the influenza virus hemagglutinin as a neo-self-antigen. *J Clin Immunol* 15: 106S-112S, 1995.

Cazac BB und Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13: 443-451, 2000.

Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 95: 409-417, 1998.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237-1240, 1994.

Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376: 177-180, 1995.

Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.

Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci* 98: 13306-13311, 2001.

Cosnes J, Beaugerie L, Carbornnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 120: 1093-1099, 2001.

Cohn SM, Simon TC, Roth KA, Bluthmann H, Kisielow P, Uematsu Y, Malissen M, Krimpenfort P, Berns A, von Boehmer H, Steinmetz M. T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature* 334: 156-159, 1988.

Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, Elson CO. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol* 169: 6112-6119, 2002.

Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 165: 4848-4853, 2000.

Crohn's Colitis Foundation of America (<http://www.ccfa.org>).

Davies MD und Parrott DM. The early appearance of specific cytotoxic T cells in murine gut mucosa. Clin Exp Immunol 42: 273-279, 1980.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphatesodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol 114: 385–391, 1998.

Dohi T, Fujihashi K, Koga T, Shirai Y, Kawamura YI, Ejima C, Kato R, Saitoh K, McGhee JR. T helper type-2 cells induce ileal villus atrophy, goblet cell metaplasia, and wasting disease in T cell-deficient mice. Gastroenterology 124: 672-682, 2003.

Dowdle WR, Coleman MT, Gregg MB. Natural history of influenza type A in the United States, 1957-1972. Prog Med Virol 17: 91-135, 1974.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol 102: 448-455, 1995.

Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. Eur J Immunol 26: 934–938, 1996.

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, Brown JL, Ehrlich GD, Weeks DE, Aston CE. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. Am J Hum Genet. 63: 95-100, 1998.

Ebert EC. Human intestinal intraepithelial lymphocytes have potent chemotactic activity. Gastroenterology 109: 1154-1159, 1995.

Ebert EC. Do the CD45RO+CD8+ intestinal intraepithelial T lymphocytes have the characteristics of memory cells? Cell Immunol 147: 331-340, 1993.

Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW.

Characterization of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 62: 240–248, 2000.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* 411: 494-498, 2001.

Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune response and protection by tolerance. *J Immunol* 157: 2174–2185, 1996.

Elson CO. Experimental models of intestinal inflammation: new insights into mechanisms of mucosal homeostasis. S. 1007-1024 in Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR (Editoren): *Mucosal immunology*. Academic Press, 1999.

Farstad IN, Carlsen H, Morton HC, Brandtzaeg P. Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics. *Immunology* 101: 354-363, 2000.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205, 1998.

Fiorentino DF, Zlotnick A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815–3822, 1991.

Friedman A und Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6688-6692, 1994.

Fujimura Y und Owen RL. M cells as portals of infection: clinical and pathophysiological aspects. *Infect Agents Dis* 5: 144-156, 1996.

Fukaure H, Kent SC, Pietrusiewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 98: 70-77, 1996.

Fuleihan R, Ramesh N, Geha RS. Role of CD40-CD40-ligand interaction in Ig-isotype switching. *Curr Opin Immunol* 5: 963-967, 1993.

Fuss IJ, Neurath MF, Boirivant M, Klein JS, Motte de la C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157: 1261-1270, 1996.

Fuss IJ, Marth T, Neurath M, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 117: 1078-1088, 1999.

Fuss IJ, Boirivant M, Lacey B, Strober W. The interrelated roles of TGF beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol* 168: 900-908, 2002.

Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, Malagelada J. Derangement of mucosal barrier function by bacteria colonizing the rat colonic mucosa. *Eur J Clin Invest* 28: 1019-1026, 1998.

Ginkel van FW, Wahl SM, Kearney JF, Kweon MN, Fujihashi K, Burrows PD, Kiyono H, McGhee JR. Partial IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice. *J Immunol* 163: 1951-1957, 1999.

Gonnella PA und Wilmore DW. Co-localization of class II antigen and exogenous antigen in the rat enterocyte. *J Cell Sci* 106: 937-940, 1993.

Gorbach SL. The intestinal microflora and its colon cancer connection. *Infect* 10: 379-384, 1982.

Gordon JW and Ruddle FH. DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow-a review. *Gene* 33: 121-136, 1985.

Gorelik L und Flavell RA. Abrogation of TGF beta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12: 171–181, 2000.

Green RP, Cohn SM, Sacchettini JC, Jackson KE, Gordon JI. The mouse intestinal fatty acid binding protein gene: nucleotide sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product. *DNA Cell Biol* 11: 31-41, 1992.

Groux H, Bigler M, deVries JE, Roncarolo M. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184: 19–29, 1996.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-742, 1997.

Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 84: 3261-3282, 1994.

Hackett CJ, Dietzschold B, Gerhard W, Ghrist B, Knorr R, Gillessen D, Melchers F. Influenza virus site recognized by a murine helper T cell specific for H1 strains. Localization to a nine amino acid sequence in the hemagglutinin molecule. *J Exp Med* 158: 294-302, 1983.

Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, Wei SH, Aranda R, Cheroutre H. Altered immune responses in interleukin-10 transgenic mice. *J Exp Med* 185: 2101–2110, 1997.

Harrisons Internal Medicine Online. (<http://www.harrisonsline.com>).

Hay JW, Hay AR. Inflammatory bowel disease: costs-of-illness. *J Clin Gastroenterol* 14: 309-317, 1992.

Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2: 997-1003, 2001.

Helgeland L, Johansen FE, Utgaard JO, Vaage JT, Brandtzaeg P. Oligoclonality of rat intestinal intraepithelial T lymphocytes: overlapping TCR beta-chain repertoires in the CD4 single-positive and CD4/CD8 double-positive subsets. *J Immunol* 162: 2683-2692, 1999.

Henderson B, Wilson M. Homo bacteriens and a network of surprises. *J Med Microbiol* 45: 393-394, 1996.

Hermiston ML und Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative Ncadherin. *Science* 270: 1203-1207, 1995.

Higgins LM, McDonald SA, Whittle N, Crockett N, Shields JG, MacDonald TT. Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J Immunol* 162: 486-493, 1999.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*;11: 1026-1030, 1993.

Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27, 1994.

Hornquist CE, Lu X, Rogers-Fani PM, Rudolph U, Shappell S, Birnbaumer L, Harriman GR. G(alpha)i2-deficient mice with colitis exhibit a local increase in memory CD4⁺ T cells and proinflammatory Th1-type cytokines. *J Immunol* 158: 1068-1077, 1997.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061, 2003.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-823, 1996.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603, 2001.

Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, Simister NE. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* 92: 69-74, 1997.

Iwasaki A und Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190: 229-239, 1999.

Iwasaki A und Kelsall BL. Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *Am J Physiol* 276: 1074-1078, 1999.

Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 20: 1097-1103, 1990.

Jewell DP. Ulcerative colitis. S. 1305-1327 in Sleisenger und Fordtran (Editoren): *Gastrointestinal disease*. Saunders Company, 1993.

Johnston RB. Monocytes and macrophages. S. 467-479 in Lachmann PJ, Peters K, Rosen FS, Walport MJ (Editoren): *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Scientific Publications, 1993.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2: 301-306, 2001.

Kagi D, Seiler P, Pavlovic J, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* 25: 3256-3262, 1995.

Kagi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Hengartner H. Development of insulinitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. *J Exp Med* 183: 2143-2152, 1996.

Kalberer CP, Reininger L, Melchers F, Rolink AG. Priming of helper T cell-dependent antibody responses by hemagglutinin-transgenic B cells. *Eur J Immunol* 27: 2400-2407, 1997.

Kilbourne ED. The influenza viruses and influenza – an introduction. S. 1-14 in: *The Influenza Viruses and influenza*. Academic Press, 1975.

Kilshaw PJ und Murant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 20: 2201-2207, 1990.

Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, Boehmer von H. Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 180: 25-34, 1994.

Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335: 730-733, 1988.

Kitajima S, Takoma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Animal* 48: 137–143, 1999.

Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro T, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10: 387–398, 1999.

Kornbluth A, Salomon P, Sacchar DB. Crohn's disease. S. 1270-1295 in Sleisenger und Fordtran (Editoren): *Gastrointestinal disease*. Saunders Company, 1993.

Köhne G, Schneider T, Zeitz M. Mukosales gastrointestinales Immunsystem (GIS) in **Ganten D, Ruckpaul K (Editoren):** *Immunsystem und Infektiologie*. Springer-Verlag, 1999.

Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 44: 775-782, 1995.

Kreuwel HTC, Aung S, Silao C, Sherman LA. Memory CD8⁺ T cells undergo peripheral tolerance. *Immunity*, 17: 73-81, 2002

Kucharzik T, Lugering N, Rautenberg K, Lugering A, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 915: 171-183, 2000.

Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274, 1993.

Kulkarni AB, Huh C-G, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci* 90: 770–774, 1993.

Kullberg MC, Ward JM, Gorelick PL, Caspar P, Hieny S, Cheever A, Jankovic D, Sher A. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogenfree interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12 and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun* 66: 5157–5166, 1998.

Kullberg MC, Rothfuchs AG, Jankovic D, Caspar P, Wynn TA, Gorelick PL, Cheever AW, Sher A. *Helicobacter hepaticus*-induced colitis in interleukin-10-deficient mice: cytokine requirements for the induction and maintenance of intestinal inflammation. *Infect Immunol* 69: 4232–4241, 2001.

Kuwano K, Braciale TJ, Ennis FA. Cytotoxic T lymphocytes recognize a cross-reactive epitope on the transmembrane region of influenza H1 and H2 hemagglutinins. *Viral Immunol.* 2: 163-173, 1989.

Lazenby A, Birkenmeier EH, Sundberg JP, Elson CO. CD4⁺ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 16: 855–864, 1998.

Lefrancois L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 147: 1746-1751, 1991.

Lefrancois L, Barrett TA, Havran WL, Puddington L. Developmental expression of the alpha IEL beta 7 integrin on T cell receptor gamma delta and T cell receptor alpha beta T cells. *Eur J Immunol* 24: 635-640, 1994.

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70: 845-857, 2002.

Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 234: 29–40, 2001.

Lin TJ und Befus AD. Mast Cells and eosinophils in mucosal defenses and pathogenesis. S. 469-482 in Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR (Editoren): *Mucosal immunology*. Academic Press, 1999.

Liu SZ, Jin SZ, Liu XD, Sun YM. Role of CD28/B7 costimulation and IL-12/IL-10 interaction in the radiation-induced immune changes. *Immunol* 2: 8, 2001.

Lockhart DJ und Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827-836, 2000.

Lucas PJ, Kim SJ, Melby SJ, Gress RE. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *J Exp Med* 191: 1187–1196, 2000.

Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. The effect of TGF beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol* 30: 2101–2111, 2000.

Ma A, Datta M, Margosian E, Chen J, Horak I. T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J Exp Med* 182: 1567-1572, 1995.

Madara JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60: 143-159, 1998.

Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 5: 262–270, 1999.

Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4: 471-481, 1996.

Malmstrom V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, Powrie F. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 166: 6972-6981, 2001.

Maloy KJ and Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2: 816-822, 2001.

Marth T, Strober W, Kelsall BL. High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: systemic neutralization of IL-12 augments TGF-beta secretion and T cell apoptosis. *J Immunol* 157: 2348-2357, 1996.

Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274: 204-208, 1996.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045, 1994.

Melamed D und Friedman A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol* 23: 935-942, 1993.

Mellman I, Turley SJ, Steinman RM. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol* 8: 231-237, 1998.

Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 174: 791-798, 1991.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Spiekermann GM, Tonegawa S, Nagler-Anderson C, Bhan AK. Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 183: 847-856, 1996.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Saubermann LJ, Higaki K, Blumberg RS, Bhan AK. Limited CD4 T-cell diversity associated with colitis in T-cell receptor alpha mutant mice requires a T helper 2 environment. *Gastroenterology* 119: 983-995, 2000.

Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan AK. Role of cytokines in the early stages of chronic colitis in TCR-alpha-mutant mice. *Lab Invest* 76: 385-397, 1997.

Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360: 225-231, 1992.

Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 50 (Suppl 3): III60-III64, 2002.

Morgan DJ, Liblau R, Scott B, Fleck S, McDevitt HO, Sarvetnick N, Lo D, Sherman LA. CD8+ T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* 157: 978-983, 1996.

Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med* 178: 237-244, 1993.

Moser M und Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1: 199-205, 2000.

Moskophidis D, Pircher H, Ciernik I, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Suppression of virus-specific antibody production by CD8+ class I-restricted antiviral cytotoxic T cells in vivo. *J Virol* 66: 3661-3668, 1992.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357, 1986.

Mowat AM, Lamont AG, Strobel S, Mackenzie S. The role of antigen processing and suppressor T cells in immune responses to dietary proteins in mice. *Adv Exp Med Biol* 216: 709-720, 1987.

Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL. Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-12 dependent selection. *Science* 292: 1907–1910, 2001.

Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 1: 59-67, 2001.

Nakajima A, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Saito N, Suzuki R, Nishino H, Yamamoto K, Silver J, Matsushashi N. Specific clonal T cell accumulation in intestinal lesions of Crohn's disease. *J Immunol.* 157: 5683-5688, 1996.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194: 629-644, 2001.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182: 1281–1290, 1995.

Neurath MF, Fuss IJ, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF- β -mediated oral tolerance. *J Exp Med* 183: 2605–2616, 1996.

Neurath MF und Stange EF. Evidenzbasierte Immunsuppression bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 97: 1977-1983, 2000.

Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 8: 567-573, 2002.

Neutra MR. Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 274: G785-G791, 1998.

Nicaise P, Gleizes A, Sandre C, Kergot R, Lebrec H, Forestier F Labarre C. The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. *Eur Cytokine Netw.* 10: 366-372, 1999.

Nielen MB, Monsurro V, Migueles SA, Wang E, Perez-Diez A, Lee KH, Kammula U, Rosenberg SA, Marincola FM. Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8+ T cells. *J Immunol*, 165: 2287-2296, 2000.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11: 141-151, 1999.

Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76: 229-239, 1994.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606, 2001.

Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and change in intestinal microflora. *Jpn J Gastroenterol* 82: 1327-1336, 1985.

Okazaki T, Iwai Y, Honjo T. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol* 14: 779-782, 2002.

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324: 84-88, 1991.

Owen GM. Nutrition surveys. *JAMA* 230: 1255, 1974.

Owen RL und Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's Patches: an ultrastructural study of intestinallymphoid organs. *Scanning Electron Microsc.* 2: 189-203, 1974.

Pappo J, Ermak TH, Steger HJ. Monoclonal antibody-directed targeting of fluorescent polystyrene microspheres to Peyer's patch M cells. *Immunology* 73: 277-280, 1991.

Pardoux C, Asselin-Paturel C, Chehimi J, Gay F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Functional interaction between TGF-beta and IL-12 in human primary allogeneic cytotoxicity and proliferative response. *J Immunol* 158: 136-143, 1997.

Pinto D, Robine S, Jaisser F, El Marjou FE, Louvard D. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem* 274: 6476-6482, 1999.

Pirzer UC, Schurmann G, Post S, Betzler M, Meuer SC. Differential responsiveness to CD3-Ti vs. CD2-dependent activation of human intestinal T lymphocytes. *Eur J Immunol* 20: 2339-2342, 1990.

Pitman RS und Blumberg RS. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J Gastroenterol* 35: 805-814, 2000.

Playford RJ, Marchbank T, Goodlad RA, Chinery RA, Poulson R, Hanby AM. Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci* 93: 2137-2142, 1996.

Podolsky D.K. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med* 325: 928-37, 1991.

Podolsky D.K. Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med* 325: 1008-16, 1991.

Podolsky DK. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* 277: G495-G499, 1999.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. *Int Immunol* 5: 1461–1471, 1993.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1: 553–562, 1994.

Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^(low) CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 183: 2669–2674, 1996.

Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzaheh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167: 5067–5076, 2001.

Putz R und Pabst R (Herausgeber): Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen. Urban und Fischer-Verlag, 2000.

Qiao L, Schurmann G, Autschbach F, Wallich R, Meuer SC. Human intestinal mucosa alters T-cell reactivities. *Gastroenterology* 105: 814–819, 1993.

Raedler S und Schreiber S. Ist die Colitis ulcerosa eine Autoimmunerkrankung? *Dtsch med Wochenschr* 117: 1333–1338, 1992.

Ranscht B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr Opin Cell Biol* 6: 740–746, 1994.

Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J, Sartor RB. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 69: 2277–2285, 2001.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295-302, 2000.

Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204: 572-581, 2001.

Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, Cummings JH. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutr Rev* 53: 127-130, 1995.

Robinson JK, Blanchard TG, Levine AD, Emancipator SN, Lamm ME. A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *J Immunol* 166: 3688-3692, 2001.

Romagnani P, Annunziato F, Baccari MC, Parronchi P. T cells and cytokines in Crohn's disease. *Curr Opin Immunol* 9: 793-799, 1997.

Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Lienard D, Cerottini, JC, Cerundolo V. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigenexperienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1641-1650, 1998.

Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12: 676-683, 2000.

Ruiz-Velasco N, Guerrero-Esteo M, Briskin MJ, Teixido J. The alpha(4) integrin subunit Tyr(187) has a key role in alpha(4)beta(7)-dependent cell adhesion. *J Biol Chem* 275: 7052-7059, 2000.

Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75: 203-205, 1993.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164, 1995.

Sakaguchi S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol*;12: 684-690, 2000.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat Immunol* 4: 10-11, 2003.

Salmi M und Jalkanen S. Molecules controlling lymphocyte migration to the gut. *Gut* 1999 45: 148-153, 1999.

Sartor RB. Role of the intestinal microflora in pathogenesis and complications. S. 175-187 in Schölmerich J, Kruis W, Goebell H (Editoren): *Inflammatory Bowel Diseases. Pathophysiology as Basis of Treatment.* Kluwer Academic Publishers, 1992.

Sarukhan A, Lanoue A, Franzke A, Brousse N, Buer J, Boehmer von H. Changes in function of antigen-specific lymphocytes correlating with progression towards diabetes in a transgenic model. *EMBO J* 17: 71-80, 1998.

Savage DC. Introduction to mechanisms of association of indigenous microbes. *Am J Clin Nutr* 32: 113-118, 1979.

Savage DC. Morphological diversity among members of the gastrointestinal microflora. *Int Rev Cytol* 82: 305-334, 1983

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10614-10619, 1996.

Schenkel J. *Transgene Tiere.* Spektrum-Verlag, 1995.

Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B, Jorup C, Grillner L, Ljungh A, Mollby R. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and non-relapsing colitis. *Scand J Gastroenterol* 28: 1077–1085, 1993.

Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO. pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol* 18: 153-160, 1998.

Shanahan F, Duerr RH, Rotter JI, Yang H, Sutherland LR, McElree C, Landers CJ, Targan SR. Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 103: 456-461, 1992.

Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 6: 107-115, 2000.

Shao L, Serrano D, Mayer L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol* 13: 163-176, 2001.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawloski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693–699, 1992.

Simon GL und Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86: 174-193, 1984.

Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Terhorst C. Evidence that CD4+ but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol* 25: 2618–2625, 1995.

Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, Sjodahl R. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117: 65-72, 1999.

Spencer SS, Di Marco FS, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 187: 571-578, 1998.

Stallmach A. und Carstens O. Role of infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 8: 213-217, 2002.

Steiniger B, Falk P, Lohmuller M, van der Meide PH. Class II MHC antigens in the rat digestive system. Normal distribution and induced expression after interferon-gamma treatment in vivo. *Immunology* 68: 507-513, 1989.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-96, 1991.

Steinmetz M, Bluthmann H, Ryser S, Uematsu Y. Transgenic mice to study T-cell receptor gene regulation and repertoire formation. *Genome* 31: 652-655, 1989.

Strober W, Fuss IJ, Ehrhardt RO, Neurath M, Boirivant M, Ludviksson BR. Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: new insights from murine models of inflammation. *Scand J Immunol* 48: 453-458, 1998a.

Strober W, Kelsall B, Marth T. Oral tolerance. *J Clin Immunol* 18: 1-30, 1998b.

Strober W, Fuss I, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 495-549, 2002.

Sweetser DA, Birkenmeier EH, Hoppe PC, McKeel DW, Gordon JI. Mechanisms underlying generation of gradients in gene expression within the intestine: an analysis using transgenic mice containing fatty acid binding protein-human growth hormone fusion genes. *Genes Dev* 2: 1318-1332, 1988.

Szabo SJ, Jacobson NG, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 2: 665-675, 1995.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 665–669, 2000.

Stumbles PJ, Mc William AS, Holt PG. Dendritic cells and macrophages. S. 397-412 in Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR (Editoren): *Mucosal immunology*. Academic Press, 1999.

Takahashi I, Iijima H, Katashima R, Itakura M, Kiyono H. Clonal expansion of CD4⁺ TCR beta beta⁺ T cells in TCR alpha-chain-deficient mice by gut derived antigens. *J Immunol* 162: 1843–1850, 1999.

Takashi I, Kiyono H, Hamada S. CD4⁺T cell population mediates development of inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice. *Gastroenterology* 112: 1876–1886, 1997.

Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H, Farre MA, Karska K, Rossmann P, Kolinska J, Kocna P. Molecular mimicry as a possible cause of autoimmune reactions in celiac disease? Antibodies to gliadin cross-react with epitopes on enterocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 74: 170-176, 1995.

Uematsu Y, Ryser S, Dembic Z, Borgulya P, Krimpenfort P, Berns A, von Boehmer H, Steinmetz M. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52: 831-841, 1988.

Uematsu Y. Transgenic mice to study T-cell receptor gene regulation and repertoire formation. *Genome* 31: 652-655, 1989.

Ullrich R, Schieferdecker HL, Ziegler K, Riecken EO, Zeitz M. Gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium. *Cell Immunol* 128: 619-627, 1990.

Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18: 415-428, 2003.

Vezys V, Olson S, Lefrancois L. Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* 12: 505-514, 2000.

Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, Browning JL. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 198: 175-218, 1995.

Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356: 793-796, 1992.

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3: 947-954, 2001.

Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 147: 2155-2163, 1991.

Wiley DC und Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56: 365-394, 1987.

Wilson A, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289: 366-373, 1981.

Winter De H, Elewaut D, Turovskaya O, Huflejt M, Shimeld C, Hagenbaugh A, Binder S, Takahashi I, Kronenberg M, Cheroutre H. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122: 1829-1841, 2002.

Wirtz S, Finotto S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. Chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF plus IFN- γ -producing CD4⁺ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol* 162: 1884–1888, 1999a.

Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure.

Gut. 44: 800-807, 1999b.

Wong WM, Poulson R, Wright NA. Trefoil peptides. Gut 44: 890-895, 1999.

Yoon JW and Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. Ann N Y Acad Sci 928: 200-211, 2001.

Zheng W und Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell 89: 587-596, 1997.

Zimmer KP, Buning J, Weber P, Kaiserlian D, Strobel S. Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. Gastroenterology 118: 128-137, 2000.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb	Abbildung
AP	Allophycocyanin
APC	engl. Antigen Presenting Cells
BCP	1-Brom-3-Chlorpropan
bp	Basenpaare
ca.	circa
Caco-2	Coloncarcinom-Zelllinie
CD	engl. Cluster of Differentiation
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CDR	engl. Complex Diversity Region
CEDE	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFSE	5-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester
CMV	Cytomegalovirus
Con A	Concavalin A
cpm	engl. counts per minute
C _T	engl. Treshold Cycle
CTLA-4	engl. Cytolytic T-Lymphocyte Associated Molecule-4
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyn-Ncleosid-5'-Triphosphat
DSS	engl. Dextran-Sulfate-Sodium
DTH	engl. Delayed Type Hypersensitivity
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECP	engl. Eosinophil Cationic Protein
EDN	engl. Eosinophil-Derived Neurotoxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FABPi	engl. intestinal Fatty-Acid-Binding-Protein
FACS	engl. Fluorescence-Activated Cell Sorter
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
Fc γ _n -Rezeptor	Fibronectin-Rezeptor
FCS	engl. foetal calf serum
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FoxP3	engl. Forkhead/winged helix Protein 3
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAD	Glutamatdecarboxylase
GALT	engl. Gut-Associated Lymphoid Tissue
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GFAP	engl. Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	engl. Green Fluorescent Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hemagglutinin
HEV	engl. Human Endothelial Venules
HPSF	engl. High Purity Salt Free
IEC	engl. Intestinal Epithelial Cells
IEL	Intestinale intraepitheliale Lymphozyten
IFABP	engl. Intestinal Fatty Acid Binding Promotor
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IRES	engl. Intraribosomal-Entry-Site
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
LF	Lymphfollikel
LLO	Lysteriolysin O
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid

Lsg	Lösung
M	molar
mAb	engl. monoclonal Antibody
MadCAM-1	engl. Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MBP	engl. Major Basic Protein
MC	Morbus Crohn
MEM	engl. Minimum Essential Medium
MFI	engl. Mean Fluorescence Intensity
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MLN	engl. Mesenteric Lymph Nodes
mRNA	messenger Ribonukleinsäuren
M-Zellen	engl. Microfold-Cells
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NTG	Nicht-transgene Geschwistertiere
OD	Optische Dichte
Oligo	dT Oligonukleotid Desoxy-Thymidin
Ova	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PD-1	engl. Programmed Death-1
PE	Phycoerythrin
pIGR	polymere Immunoglobulinrezeptoren
PO	Peroxidase
PP	Peyersche Plaques
RAG	Rekombinationsaktivierende Gene
rpm	engl. rounds per minute
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
RPS9	Ribosomales Protein S9
RT	Raumtemperatur
RT-Polymerase	Reverse Transkriptase-Polymerase
SCID	engl. Severe Combined Immunodeficiency

SDS	engl. Sodiumdodecylsulfate
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SPC	engl. Surfactant Protein C
SPF	engl. Specific Pathogen Free
SSC	engl. Saline Sodium Citrate
STAT4	engl. Signal Transducer and Activator of Transcription
T _A	Anlagerungstemperatur
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCR	engl. T Cell Receptor
TE	Tris/EDTA
TGF- β	engl. Tumor Growth Factor β
T _H -Zellen	Helfer-T-Zellen
TNBS	Trinitrobenzol-Sulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosisfaktor α
T _R -Zellen	regulatorische T-Zellen
U	engl. Unit
ÜN	Übernacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
V β	variable β -Kette des T-Zellrezeptors
VSV	Vesikulärer Stomatitis Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
β 2M	β 2-Mikroglobulin
°C	Grad Celsius

8 Abbildungsverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abb. 1-1: Bildtafel zum Erscheinungsbild von CEDE	3
Abb. 1-2: Hypothesen zur Ätiologie von Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	5
Abb. 1-3: Gastrointestinaltrakt des Menschen.....	9
Abb. 1-4: Oberflächenvergrößerung im Darmepithel.....	10
Abb. 1-5: Aufbau der Dünndarmwand	11
Abb. 1-6: Antigenpräsentation im Peyerschen Plaque.....	15
Abb. 1-7: Immunregulation im Peyerschen Plaque	19
Abb. 1-8: Hemagglutinin Influenza Virus A PR/8/34	40
Abb. 1-9: Expressionsprofile der verschiedenen Darm-Promotoren	42
Abb. 1-10: Eigenschaften der HA-spezifischen TCR-transgenen Mauslinien	43
Abb. 1-11: Übersicht der HA-spezifischen TCR-transgenen Mausmodelle.....	44
Abb. 2-1: Aufbau der Blotting-Apparatur.....	56
Abb. 3-1: Generierung der IFABP-HA transgenen Mäuse.....	77
Abb. 3-2: Generierung der FABPi-HA transgenen Mäuse	80
Abb. 3-3: Generierung der Villin-HA transgenen Mäuse.....	83
Abb. 3-4: Detektion transgener Mäuse mit spezifischen Primern	84
Abb. 3-5: RNA-Expression in HA-transgenen Mauslinien	87
Abb. 3-6: HA Expression in Villin-HA transgenen Mauslinien.....	89
Abb. 3-7: Wiederauffindungsrate transferierter 6.5 CD4 T-Zellen	91
Abb. 3-8: Aktivierung von 6.5+ CD4+ T-Zellen in Villin-HA Mäusen.....	93
Abb. 3-9: Infiltration des Dünndarms durch Lymphozyten in Transferexperimenten	94
Abb. 3-10: Proliferation adoptiv transferierter 6.5+ CD4+ T-Zellen	97
Abb. 3-11: Zentrale Toleranz und Entwicklung von 6.5+ CD4+ Lymphozyten im Thymus.....	100
Abb. 3-12: Anteil 6.5+ CD4+ transgener T-Zellen in lymphatischen Organen	101
Abb. 3-13: Aktivierung von 6.5+ CD4+ T-Zellen in Villin-HA x TCR-HA transgenen Mäusen.....	103
Abb. 3-14: Antigenstimulationsversuche mit 6.5+ CD4+ T-Zellen	105

Abb. 3-15: Infiltration des Dünndarms durch Lymphozyten.....	107
Abb. 3-16: Relative Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in 6.5+ CD4+ CD25+ und 6.5+ CD4+ CD25- T-Zellen	109
Abb. 3-17: Ulzerative Enterocolitis in doppelt-transgenen Villin-HA x CL4-TCR Mäusen	111
Abb. 3-18: Zentrale Toleranz und Entwicklung von V β 8+ CD8+ Lymphozyten im Thymus.....	113
Abb. 3-19: Anteil V β 8+ CD8+ transgener T-Zellen in lymphatischen Organen.....	114
Abb. 3-20: Aktivierung von V β 8+ CD8+ T-Zellen in doppelt-transgenen Villin- HA x CL4-TCR Mäusen	116
Abb. 3-21: Nachweis HA-spezifischer T-Zellen mit HA-spezifischen Tetrameren in Villin-HA x CL4-TCR Mäusen	117
Abb. 3-22: Antigenstimulationsversuche mit V β 8+ CD8+ T-Zellen	119
Abb. 3-23: Antigenstimulationsversuche mit sortierten V β 8+ CD8+ T-Zellen	120
Abb. 3-24: Infiltration des Dünndarms durch Lymphozyten.....	122
Abb. 4-1: Adenoviraler Vektor	139

8.2 Tabellen

Tab. 1-1: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich.....	1
Tab. 1-2: Zytokinexpression CD4-positiver T-Zellsubpopulationen.....	20
Tab. 1-3: Expression von Oberflächenmolekülen auf LPL und IEL	24
Tab. 1-4: Mausmodelle der CEDE.....	29
Tab. 2-1: Standardpuffer und Medien für molekularbiologische Methoden	47
Tab. 2-2: Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA	50
Tab. 2-3: Oligonukleotidprimerpaare zur Detektion transgener Mäuse	53
Tab. 2-4: Lösungen und Reagenzien zur Durchführung von Southern Blots.....	54
Tab. 2-5: Primerpaare zur semiquantitativen Expressionsanalyse.....	60
Tab. 2-6: Oligonukleotidprimerpaare zur quantitativen Expressionsanalyse.....	62
Tab. 2-7: Verwendete Puffer und Reagenzien zur Durchführung von Western Blots....	63
Tab. 2-8: Medien und Puffer für die Zellkultur	66
Tab. 2-9: Verwendete Antikörper und Fluorophorkonjugate	69
Tab. 4-1: Generierte HA-transgene Mauslinien.....	125